

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS ANTIANGIOGÉNIQUES DU RÉGIME MÉDITERRANÉEN :
INHIBITION DE L'ACTION DU VEGF PAR LES COMPOSÉS PHYTOCHIMIQUES DE
L'HUILE D'OLIVE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
AMIRA OUANOUI

SEPTEMBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Au terme de cet humble travail, il me tient particulièrement à coeur d'adresser mes sincères remerciements au :

- Dr Richard Béliveau qui, le premier, a cru en mes capacités et m'a ouvert les portes de son laboratoire. Sa sensible contribution financière m'a permis ainsi de poursuivre mon projet de recherche et de le mener à son terme.
- Dr Richard Desrosiers de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe de recherche et de m'avoir témoigné sa totale confiance. Ses encouragements et ses conseils à mon égard durant mes deux années de maîtrise ont été importants dans mon cheminement et très appréciés.
- Dre Sylvie Lamy qui reçoit ici un merci très spécial pour l'énorme contribution à ma formation, pour son aide précieuse et ses conseils durant tout le cycle de ma maîtrise. Sa patience, sa générosité et sa disponibilité ont été un facteur extrêmement positif et primordial dans ma persévérance dans le travail.
- Dr Borhane Annabi, Dr Richard Desrosiers et Dr Charles Couillard (Université Laval) qui ont bien voulu prendre sur leur temps précieux et accepter d'être membres du jury. Nul doute que je saurai tirer profit de leur expérience dans le domaine.
- À la fondation de l'UQÀM ainsi qu'au programme des fonds d'accessibilité à la recherche (FARE) pour m'avoir encouragée par l'octroi de deux bourses d'excellence durant mes études de maîtrise.

Il va sans dire que je ne saurai oublier Julie Poirier, notre chère technicienne, pour son aide précieuse dans mon apprentissage.

Mes remerciements vont également à mes amis(es) et collègues : Hana-Ikram, Dahmane, Houda, Khadi, Aroua, Rima, Alain, Paula, Jonathan, Amélie et Michel sans qui, les journées de laboratoire auraient été trop longues.

Tous les mots ne suffisent pas pour témoigner de la gratitude envers mes parents qui n'ont cessé et ne cessent encore de m'encourager dans mes démarches tant pédagogiques que professionnelles. Il en va également pour mes frères pour leur soutien moral.

Merci à tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à ma réussite.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTE DES FIGURES | vi |
| LISTE DES TABLEAUX | viii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES | ix |
| RÉSUMÉ | xii |
| CHAPITRE I | |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Le cancer | 1 |
| 1.1.1 Statistiques | 1 |
| 1.1.2 La cancérogenèse | 2 |
| 1.2 L'angiogenèse normale et tumorale..... | 5 |
| 1.2.1 Le « switch angiogénique » | 7 |
| 1.2.2 Les principales étapes de l'angiogenèse tumorale..... | 8 |
| 1.3 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire | 10 |
| 1.3.1 La famille du VEGF..... | 10 |
| 1.3.2 Les fonctions du VEGF | 11 |
| 1.3.3 Les récepteurs du VEGF | 11 |
| 1.3.4 Structure du VEGFR-2 | 13 |
| 1.3.5 Voies de signalisation du VEGFR-2..... | 15 |
| 1.4 La nutrition et le cancer | 18 |
| 1.4.1 Le régime méditerranéen et le cancer | 20 |
| 1.4.2 Quelques composants de l'huile d'olive et leurs effets bénéfiques pour la santé | 22 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 1.5 Hypothèse et objectifs | 24 |
|----------------------------------|----|

CHAPITRE II

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation | 26 |
| Résumé de l'article | 29 |
| 2.1 Abstract | 30 |
| 2.2 Introduction | 31 |
| 2.3 Materials and methods | 33 |
| 2.4 Results | 37 |
| 2.5 Discussion | 40 |
| 2.6 References | 44 |
| 2.7 Legends for figures | 49 |

CHAPITRE III

| | |
|-------------------------------|----|
| DISCUSSION | 57 |
| Figures supplémentaires | 63 |

CHAPITRE IV

| | |
|----------------------------------|----|
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 65 |
| ANNEXES | 68 |
| Annexe-1 | |
| RÉFÉRENCES | 69 |

LISTE DES FIGURES

| Figure | Page |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1.1 Les différentes étapes de l'angiogenèse | 2 |
| 1.2 Capacités acquises des cellules cancéreuses | 4 |
| 1.3 Les principales différences entre les vascularisation normale (physiologique) et anormale (tumorale) | 6 |
| 1.4 Balance entre les molécules proangiogéniques et antiangiogéniques régulant le « switch angiogénique » | 7 |
| 1.5 Les principales étapes de l'angiogenèse tumorale | 9 |
| 1.6 Structure des différents isoformes du gène <i>VEGFA</i> et des gènes <i>VEGFB</i> , <i>VEGFC</i> et <i>VEGFD</i> | 10 |
| 1.7 Représentation schématique des profils d'expression, de la spécificité des ligands et des effets cellulaires/physiologiques des VEGFR | 12 |
| 1.8 Structure d'un récepteur tyrosine kinase | 14 |
| 1.9 Illustration schématique de la transduction du signal par le VEGFR-2 | 17 |
| 1.10 Principaux composés de l'huile d'olive | 25 |
| 2.1 Olive oil compounds inhibit VEGF-induced tube formation of endothelial cells | 51 |
| 2.2 Olive oil compounds inhibit VEGF-induced proliferation of endothelial cells | 52 |
| 2.3 Olive oil compounds inhibit VEGF-induced migration of endothelial cells | 53 |
| 2.4 Hydroxytyrosol, taxifolin and oleic acid inhibit VEGF-induced tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 | 54 |

| | | |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5 | Hydroxytyrosol, taxifolin and oleic acid inhibit VEGF-mediated pathways in endothelial cells | 55 |
| 3.1 | Les composés de l'huile d'olive inhibent la phosphorylation du VEGFR-2 dans les HUVECs | 63 |
| 3.2 | Les molécules de l'huile d'olive n'affectent pas l'expression génique du <i>VEGFR-2</i> | 64 |

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau | Page |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1.1 Cibles pharmacologiques des composés phytochimiques alimentaires | 19 |
| 1.2 Composants de l'huile d'olive à activité antioxydante | 21 |
| 2.1 Comparative overview of IC ₅₀ values of olive oil compounds of VEGFR-2/ MAPK phosphorylation | 56 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| AO | acide oléique |
| AP-1 | protéine activatrice 1 |
| ARE | éléments de réponse anti-oxydante |
| ATP | adénosine triphosphate |
| CE | cellules endothéliales |
| CML | cellules musculaires lisses |
| Cox-2 | cyclooxygénase-2 |
| DAG | diacylglycérol |
| EGF | facteur de croissance épidermique |
| EGFR | récepteur du facteur de croissance épidermique |
| EG-VEGF | facteur de croissance de l'endothélium vasculaire dérivé de la glande endocrinienne |
| eNOS | isoforme endothéliale de la synthase de l'oxyde nitrique |
| ERK | kinases de la régulation des signaux extracellulaires |
| ETS | famille de facteurs de transcription |
| FAK | protéine d'adhésion focale |
| FGF | facteur de croissance des fibroblastes |
| HER-2 | récepteur du facteur de croissance épidermique humain |
| HIF | facteur inducteur d'hypoxie |
| HT | hydroxytyrosol |
| HUVECs | cellules endothéliales humaines de veine ombilicale |
| IGF-1 | facteur de croissance analogue à l'insuline-1 |
| IKK | inhibiteur du facteur nucléaire kappa B |
| IL-6 | interleukine 6 |
| IP-3 | inositol 1, 4, 5-triphosphate |

| | |
|----------------|------------------------------------------------------------------------|
| JNK | kinase c-Jun N-terminal |
| LDL | lipoprotéines de basse densité |
| MAPK | protéines kinases activées par les mitogènes |
| MDRP | protéines de résistance aux médicaments |
| MMPs | métalloprotéinases de la matrice extracellulaire |
| NF- κ B | facteur nucléaire kappa B |
| NO | oxyde nitrique |
| OL | oleuropéine |
| P53 | protéine tumorale 53 |
| PARP | polyadénosine diphosphate polymérase |
| PD-ECGF | facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes |
| PDGF | facteur de croissance dérivé des plaquettes |
| PI3K | phosphatidyl inositol kinase 3 |
| PIP2 | phosphatidyl inositol (4,5)-biphosphate |
| PKB | protéine kinase B |
| PKC | protéine kinase C |
| PLC γ | phospholipase C gamma |
| PTEN | phosphatase et homologue de tensine |
| PTP | phosphotyrosine phosphatase |
| ROS | espèces réactives à l'oxygène |
| Src | protéine tyrosine kinase protooncogène |
| STAT3 | transducteur de signal et activateur de la transcription 3 |
| Tax | taxifoline |
| TGF-b | facteur de croissance tumorale beta |
| TNF | facteur de nécrose tumorale |
| TSP-1 | thrombospondine 1 |
| TSP-2 | thrombospondine 2 |
| TyrOH | tyrosol |
| VEGF | facteur de croissance de l'endothélium vasculaire |
| VEGFR | récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire |

VRAP-TSAd protéine associée au récepteur du VEGF - protéine adaptatrice spécifique
aux cellules T

RÉSUMÉ

La croissance des tumeurs dépend de l'angiogenèse qui permet un apport adéquat en oxygène et en nutriments ainsi que la dissémination des cellules cancéreuses vers d'autres organes pour former des métastases. Son inhibition représente donc une stratégie efficace pour bloquer ou contrer la croissance des tumeurs. Parmi les éléments essentiels à l'initiation de l'angiogenèse tumorale, on retrouve le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui exerce son action proangiogénique en se liant à son récepteur, le VEGFR-2. Ce récepteur à activité tyrosine kinase est responsable de l'émission des signaux cellulaires nécessaires à l'angiogenèse tumorale. Ainsi, dans un contexte de prévention et de traitement du cancer, le VEGFR-2 représente une cible de choix.

Sachant que le tiers des cancers est lié à la nutrition, les molécules d'origine alimentaire sont de plus en plus considérées dans la chimioprévention. Différentes études s'intéressent à leur identification et à leurs propriétés antiangiogéniques et antitumorales dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets préventifs de ces molécules. Le régime méditerranéen est, depuis longtemps, connu pour ses effets bénéfiques pour la santé. Ces effets positifs découlent, entre autres, de l'utilisation de l'huile d'olive. Néanmoins, peu d'études ont caractérisé l'effet de l'huile d'olive sur l'angiogenèse tumorale.

L'objectif de ce mémoire est de caractériser les effets de cinq principales molécules de l'huile d'olive (hydroxytyrosol (HT), taxifoline (Tax), tyrosol (TyrOH), oleuropéine (OL) et acide oléique (AO)) sur les étapes clefs de l'angiogenèse tumorale (prolifération, migration et tubulogenèse), induites par le VEGF, dans les cellules humaines endothéliales de veine ombilicale (HUVECs). Dans notre étude, nous avons démontré que HT, Tax et AO inhibent l'angiogenèse *in vitro* dans les HUVECs. Cet effet consiste en une inhibition des processus de prolifération et de migration cellulaires ainsi que de la tubulogenèse qui sont induits par le VEGF. Le mécanisme derrière ces effets est attribuable à l'inhibition de la phosphorylation des résidus tyrosines, du VEGFR-2, Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 et Tyr1214 indispensables à l'induction de l'angiogenèse tumorale. Nous avons aussi démontré que HT, Tax et AO diminuent l'activation des voies de signalisation intracellulaires des MAPkinases (ERK et JNK) induites par le VEGF, et ce, à des concentrations qui pourraient être fournies par une alimentation à base d'huile d'olive. Nos résultats permettent donc de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'activité antiangiogénique des molécules de l'huile d'olive.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans cette étude indiquent que les molécules de l'huile d'olive sont des inhibiteurs de l'activité de VEGF dans l'angiogenèse tumorale et que cet effet pourrait contribuer aux propriétés chimiopréventives de ces molécules.

Mots clefs : cancer, prévention, alimentation, huile d'olive, angiogenèse, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Statistiques

Depuis des décennies, le cancer constitue un fléau à travers le monde et ce, malgré l'avancement des tests de diagnostic et l'augmentation des efforts dans le domaine de la recherche médicale et préventive. En effet, le cancer affecte 24 millions de gens à travers le monde, soit 6 millions de morts par année (Li *et al.*, 2012). Au Canada, chaque heure, 21 personnes recevront un diagnostic de cancer et 9 personnes mourront de cette maladie. Les statistiques canadiennes estiment qu'en 2012, 186 400 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués et 75 700 décès surviendront durant cette année. Plus de la moitié des cas seront des cancers du poumon, du côlon, du rectum, du sein et de la prostate. 27% de tous les décès par cancer sont attribuables au cancer du poumon et 12% au cancer colorectal. Les hommes seront plus nombreux que les femmes à recevoir un diagnostic de nouveau cancer (52% pour les hommes par rapport à 48% pour les femmes). Les cancers les plus couramment diagnostiqués demeurent le cancer de la prostate pour l'homme et celui du sein pour la femme (Société canadienne sur le cancer, 2012).

1.1.2 La cancérogenèse

Le développement du cancer peut prendre jusqu'à 30 ans durant lesquelles plusieurs étapes se produisent, c'est la cancérogenèse. Cette dernière consiste en l'initiation, la promotion et la progression de la tumeur (Figure 1.1). Le corps humain contient environ 13 milliards de cellules dont la majorité meurent au bout d'une centaine de jours, ce qui représente 70 000 cellules mortes par minute. Cette mort cellulaire est un processus physiologique normal (Gupta *et al.*, 2010).

Le cancer est déclenché par des altérations génétiques et épigénétiques transformant une cellule normale en cellule maligne. Les cellules cancéreuses deviennent résistantes à l'inhibition de la prolifération, prolifèrent sans la nécessité des facteurs de croissance, se multiplient sans limites, échappent à l'apoptose, envahissent, métastasient et supportent l'angiogenèse dans le but de croître et d'envahir les tissus hôtes (Folkman, 1995) (Figure 1.2). Ce processus prend des années à se développer donnant ainsi une fenêtre d'opportunité pour un blocage thérapeutique (Beliveau et Gingras, 2007).

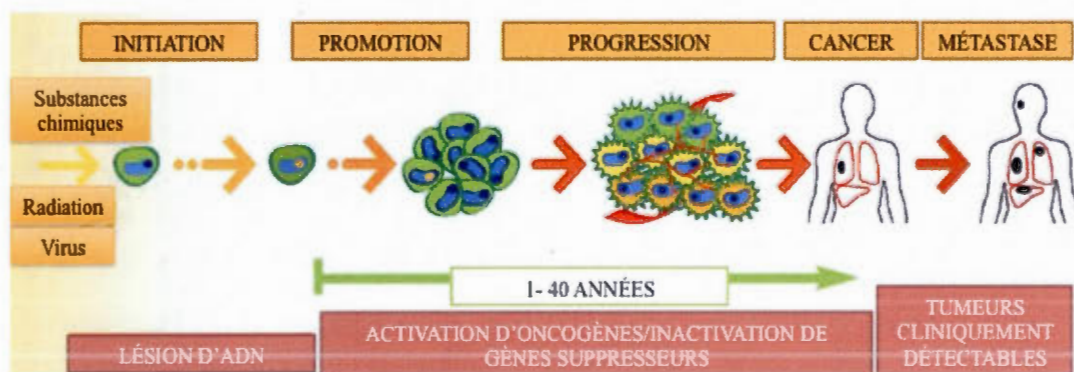


Figure 1.1 Les différentes étapes de la cancérogenèse. Une cellule normale est affectée par des agents cancérogènes et entre en phase de promotion où les oncogènes s'activent pour permettre une progression tumorale. Les tumeurs sont ainsi cliniquement détectables. Adaptée de (Beliveau et Gingras, 2007)

La cancérogenèse est un processus initié par des cancérogènes environnementaux (fumée de cigarette, émissions industrielles, vapeur d'essence), des agents inflammatoires (facteur de nécrose tumorale (TNF) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)) et des promoteurs tumoraux (esters de phorbol et acide okadaïque). Ces cancérogènes sont connus pour moduler les facteurs de transcriptions (facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), protéine activatrice (AP-1), transducteur du signal et activateur de la transcription 3 (STAT3)), les protéines anti-apoptotiques (Akt, Bcl- X_L), les protéines pro-apoptotiques (caspases, polyadenosine diphosphate polymérase (PARP)), les protéines kinases (inhibiteur de facteur nucléaire kappa B (IKK), récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), récepteur du facteur de croissance épidermique humain (HER2), kinase c-jun N-terminale (JNK), protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK)), les protéines du cycle cellulaire (cyclines), les molécules d'adhésion cellulaire ainsi que les voies de signalisation des facteurs de croissance (Aggarwal et Shishodia, 2006).

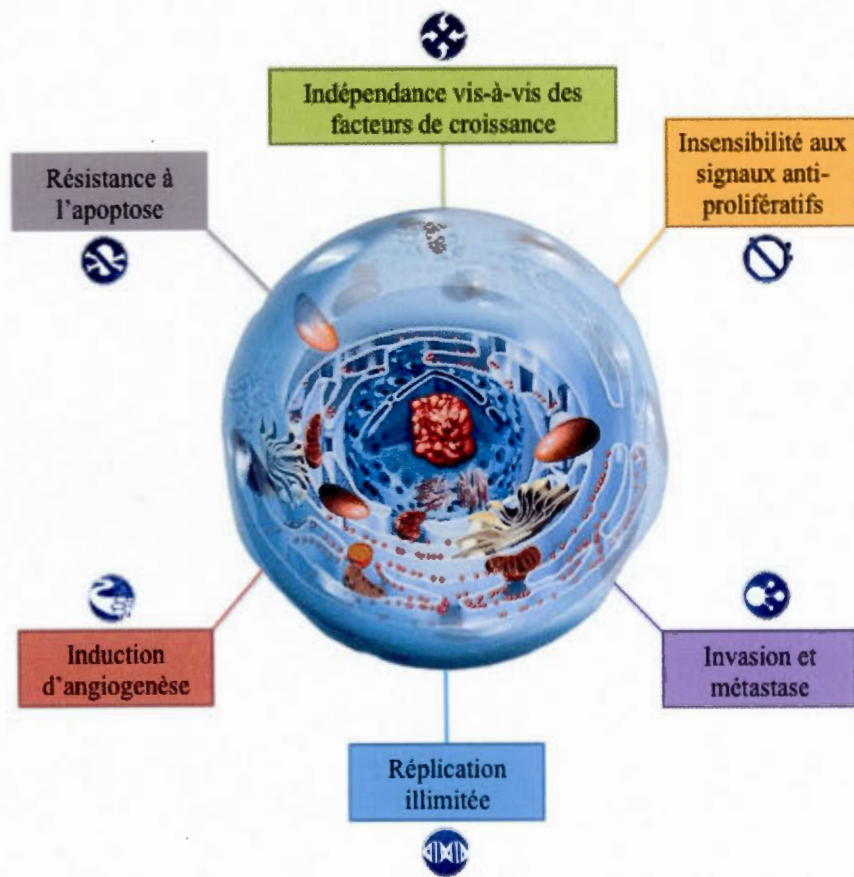


Figure 1.2 Capacités acquises des cellules cancéreuses.
Illustration modifiée (Hanahan et Weinberg, 2000)

1.2 L'angiogenèse normale et tumorale

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant (Folkman, 1995). Physiologiquement, elle joue un rôle dans le développement embryonnaire, la croissance de l'endomètre, la cicatrisation et le remodelage des tissus. Ce processus est hautement régulé par un équilibre de signaux d'activation et d'inhibition (Munoz-Chapuli, 2011). Par ailleurs, lorsque cet équilibre est dérégulé, l'angiogenèse devient pathologique et est impliquée, entre autres, dans le développement tumoral (Figure 1.3). En fait, c'est en 1971 que Judah Folkman a soulevé l'hypothèse de l'importance de l'angiogenèse dans le développement des tumeurs et qu'elle pouvait représenter une nouvelle cible thérapeutique pour contrer le cancer (Folkman, 1971). Ces études ont démontré que les tumeurs se développent initialement en captant l'oxygène et les nutriments du microenvironnement adjacent, mais ne peuvent se développer au-delà de 2 mm sans angiogenèse (Folkman, Long et Becker, 1963). Ainsi, une tumeur précancéreuse a besoin d'un apport adéquat et constant de nutriments et oxygène permettant le passage d'une phase avasculaire à une phase vasculaire prête à se développer et à envahir, par la suite, d'autres tissus. Comparativement à l'angiogenèse physiologique où les vaisseaux sont organisés d'une manière hiérarchique (artères, capillaires et veines), les nouveaux vaisseaux formés par l'angiogenèse tumorale sont structurellement et fonctionnellement anormaux, ont des branchements irréguliers, sont dilatés et hyperperméables aux petites molécules, aux fluides et protéines plasmatiques représentant ainsi une cible de choix pour bloquer la croissance tumorale (Claesson-Welsh, 2012 ; Dvorak, 2005).

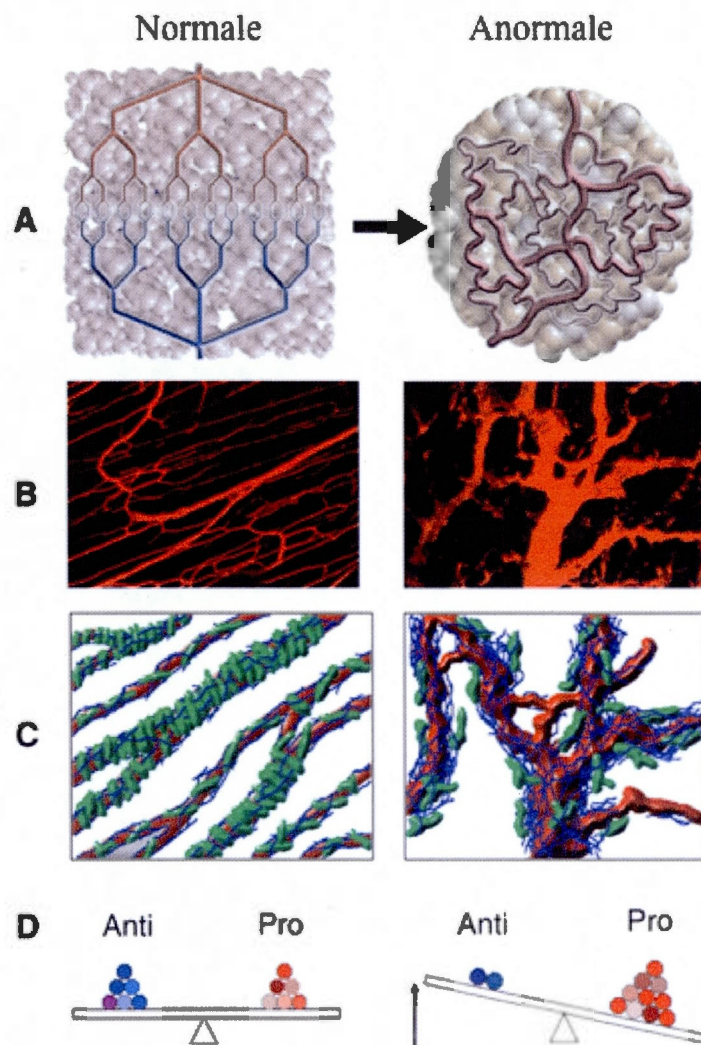


Figure 1.3 Les principales différences entre les vascularisations normale (physiologique) et anormale (tumorale). **(A)** Structures schématiques de vascularisation normale vs. anormale. **(B)** Dynamiques des vascularisations normale et anormale. **(C)** Diagrammes représentant les niveaux de la membrane basale (bleu) et des péricytes (vert). **(D)** Balance de facteurs pro- et antiangiogéniques. Anti : molécules antiangiogéniques; Pro : molécules proangiogéniques. Tirée de (Jain, 2005)

1.2.1 Le « switch angiogénique »

L'angiogenèse tumorale est initiée par le « switch » angiogénique, i.e. par un débalancement des facteurs de proangiogéniques et antiangiogéniques. Lorsque ce « switch » est en position « OFF », l'effet des molécules proangiogéniques est neutralisé par celui des molécules antiangiogéniques. Lorsque ce « switch » est en position « ON », l'équilibre est en faveur d'une angiogenèse soutenue (Figure 1.4). Différents facteurs génétiques, métaboliques ou inflammatoires favorisent ce « switch » angiogénique. Par exemple, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes ou la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs vont stimuler l'activation de molécules proangiogéniques telles que les facteurs de croissance, les cytokines ou les enzymes protéolytiques (Carmeliet et Jain, 2011)

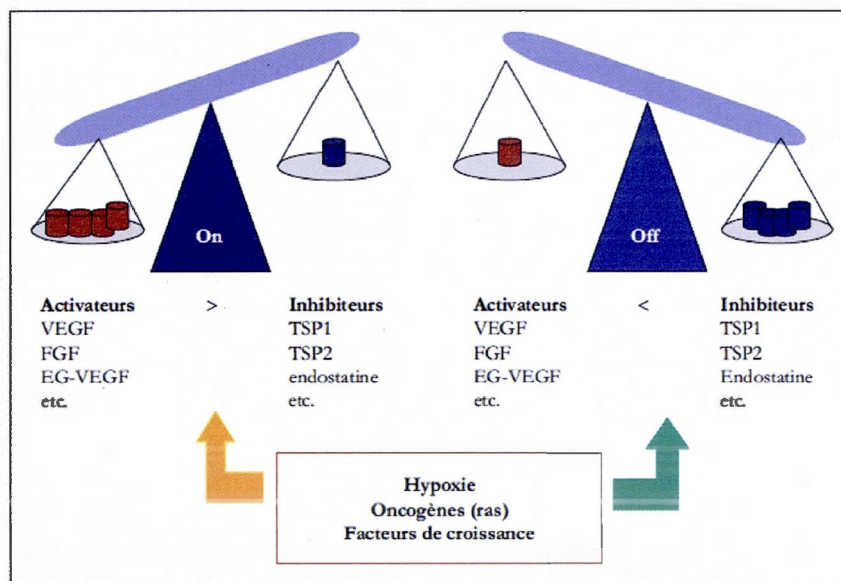


Figure 1.4 Balance entre les molécules proangiogéniques et antiangiogéniques régulant le «Switch angiogénique».

Abréviations: VEGF : vascular endothelial growth factor; EG-VEGF : endocrine gland-vascular endothelial growth factor; FGF : fibroblast growth factor; TSP1 : thrombospondine 1; TSP2 : thrombospondine 2.

Tirée de (Bikfalvi, 2003)

1.2.2 Les principales étapes de l'angiogenèse tumorale

Les cellules endothéliales tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins jouent des rôles primordiaux dans les différentes étapes de l'angiogenèse exprimant, entre autres, le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et celui de l'angiopoïétine (Tie-2). Les différents facteurs de croissance, sécrétés par les cellules tumorales en conditions d'hypoxie ou suite à l'activation par certains oncogènes, stimulent les cellules endothéliales. Ces facteurs se lient à leurs récepteurs au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales activant une cascade de signalisation intracellulaire. Les cellules endothéliales sécrètent plusieurs enzymes protéolytiques tels que les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) qui permettent la dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau sanguin. Ces cellules pénètrent la matrice extracellulaire afin de migrer et de proliférer vers la source du stimulus angiogénique. Les cellules sécrètent les composantes de la nouvelle membrane basale contribuant au remodelage du réseau capillaire, recrutent les péricytes et les cellules musculaires lisses afin de former un nouveau vaisseau sanguin fonctionnel, mais anormal (Ichihara, Kiura et Tanimoto, 2011 ; Munoz-Chapuli, 2011 ; Ribatti et Crivellato, 2012) (Figure 1.5).

Les cellules endothéliales représentent donc un modèle *in vitro* fort intéressant pour l'étude des processus physiologiques et pathologiques dépendant de l'angiogenèse (Bouis *et al.*, 2001) incluant la migration, la prolifération, la digestion protéolytique de la matrice extracellulaire et la formation de structures capillaires (Cimpean, Ribatti et Raica, 2011).

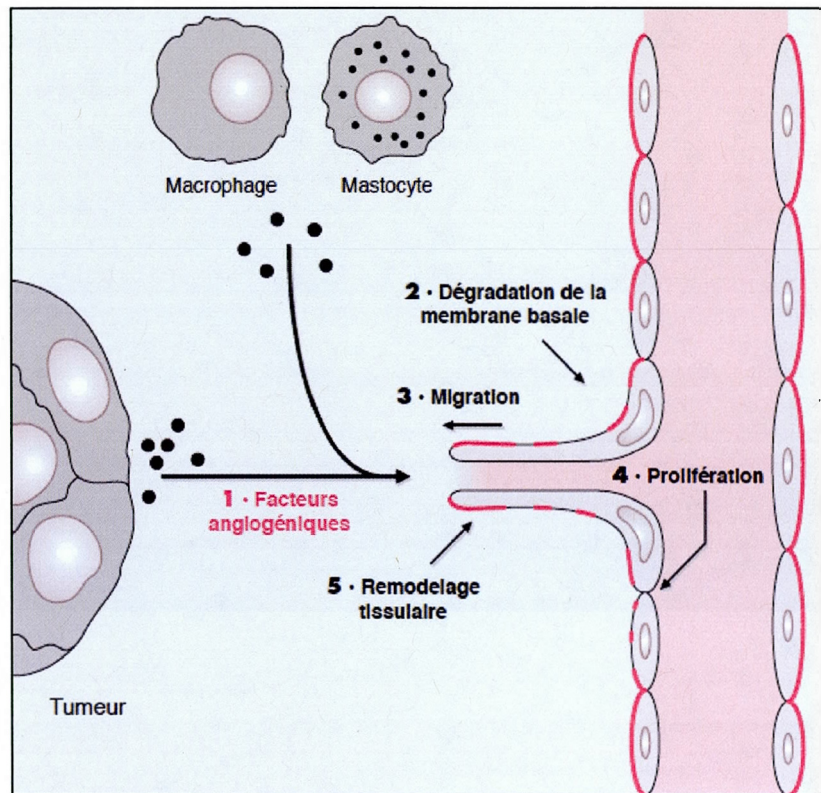


Figure 1.5 Les principales étapes de l'angiogenèse tumorale. Les facteurs angiogéniques sécrétés par la tumeur ou par les macrophages/mastocytes initient l'angiogenèse. Cette dernière consiste en la dégradation de la membrane basale, migration des cellules endothéliales, leur prolifération et finalement le remodelage tissulaire.
Tirée de (Gingras, 1997)

1.3 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

1.3.1 La famille du VEGF

Parmi les molécules angiogéniques impliquées dans la croissance vasculaire, la famille des VEGFs joue un rôle prédominant. Les VEGFs sont une famille de cinq glycoprotéines : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF. Le VEGF est une glycoprotéine homodimérique de 45 kDa. Son information génétique est localisée dans le bras court du chromosome 6 (6p21.3). Le gène *VEGFA* est constitué de huit exons avec des variantes d'épissage alternatif formant les différents isoformes *VEGFA*₁₂₁, *VEGFA*₁₄₅, *VEGFA*₁₆₅, *VEGFA*₁₈₉ et *VEGFA*₂₀₆ (Figure 1.6). L'isoforme *VEGF*₁₆₅ représente l'activité biologique la plus élevée. *VEGF*₁₆₅ et *VEGF*₁₂₁ ont une activité mitogène et augmentent la perméabilité vasculaire; tandis que le *VEGF*₁₈₉ et le *VEGF*₂₀₆ augmentent seulement la perméabilité vasculaire (Holmes *et al.*, 2007).

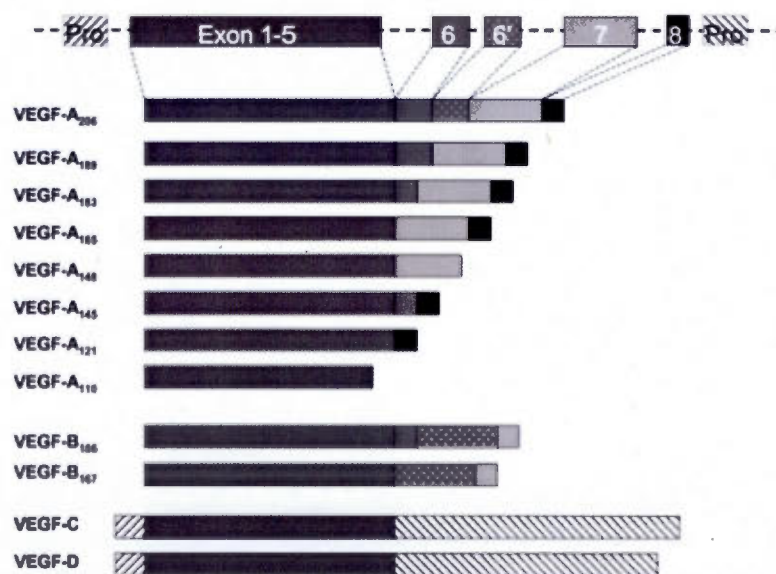


Figure 1.6 Structure des différents isoformes du gène *VEGFA* et des gènes *VEGFB*, *VEGFC* et *VEGFD*. D'après (Hoebe *et al.*, 2004).

1.3.2 Les fonctions du VEGF

Le VEGF est un mitogène des cellules endothéliales. Celui-ci stimule la prolifération, inhibe l'apoptose, augmente la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. Les ARN messagers (ARNm) et les isoformes de la protéine du VEGF sont localisés dans plusieurs tissus sains incluant le coeur, le rein, le foie, le cerveau, l'utérus, les ovaires, la peau et la muqueuse gastrique. Ce facteur est produit par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et la majorité des cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes, neutrophiles et l'éosinophiles) (Carmeliet et Jain, 2011). Le VEGF-B est localisé spécifiquement dans le muscle et est absent des cellules endothéliales. Les VEGF-C et -D ont été détectés dans les cellules musculaires lisses et les cellules neuroendocrines. En plus des tissus sains, le VEGF est surexprimé dans plusieurs types de cancer et augmente sensiblement lors de la progression de la tumeur (Carmeliet et Jain, 2011). Cette dernière sécrète le VEGF en réponse à l'hypoxie et aux facteurs de croissance incluant le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance tumoral beta (TGF-beta), l'interleukine 6 (IL-6) et l'estrogène ainsi que des mutations de Ras, de la protéine tumorale 53 (p53) et de la phosphatase et homologue de tensine (PTEN) (Carmeliet et Jain, 2011).

1.3.3 Les récepteurs du VEGF

Les principales fonctions du VEGF consistent à induire la survie et la prolifération et à améliorer la migration et l'invasion des cellules endothéliales qui contribuent à l'angiogenèse. Le VEGF régule ces fonctions en interagissant avec les récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR et en transmettant les signaux aux différentes protéines en aval (Byrne, Bouchier-Hayes et Harmey, 2005). L'activité de signalisation du VEGF est dépendante de la présence des récepteurs membranaires spécifiques: VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Le VEGFR-1 est localisé dans les cellules endothéliales, les trophoblastes, les macrophages et les monocytes. Le VEGFR-2 est exprimé principalement dans les cellules endothéliales mais aussi dans les cellules rénales, les cellules hématopoïétiques, les mégacaryocytes et les haemangioblastes. VEGFR-2 ou KDR chez l'humain et Flk1 chez la souris représente le principal récepteur de la signalisation du VEGF. Ce récepteur, au poids moléculaire de 210-230 kDa, lie le VEGF-A avec une affinité 10X plus élevée que le

VEGFR-1 (Flt-1 souris). Le VEGFR-3 est présent dans les glandes endocriniennes, dans l'endothélium des vaisseaux lymphatiques et des capillaires de la moelle osseuse. Le VEGF agit sur les cellules endothéliales via les fonctions signalitiques du VEGFR-1 et du VEGFR-2. Le VEGF-B agit via le VEGFR-1. Les VEGF-C et le -D agissent par le VEGFR-2 et le VEGFR-3 (Figure 1.7) (Kajdaniuk *et al.*, 2011).

La famille des VEGF et leurs récepteurs sont régulés par le facteur inducteur d'hypoxie (HIF) menant à leur surexpression durant le développement tissulaire physiologique et tumoral. De plus, une panoplie d'autres facteurs de transcription et régulateurs métaboliques tels que les ETS (famille de facteurs de transcription) et les ROS (espèces réactives à l'oxygène) modulent les niveaux d'expression des VEGFs et des VEGFRs (Koch et Claesson-Welsh, 2012).

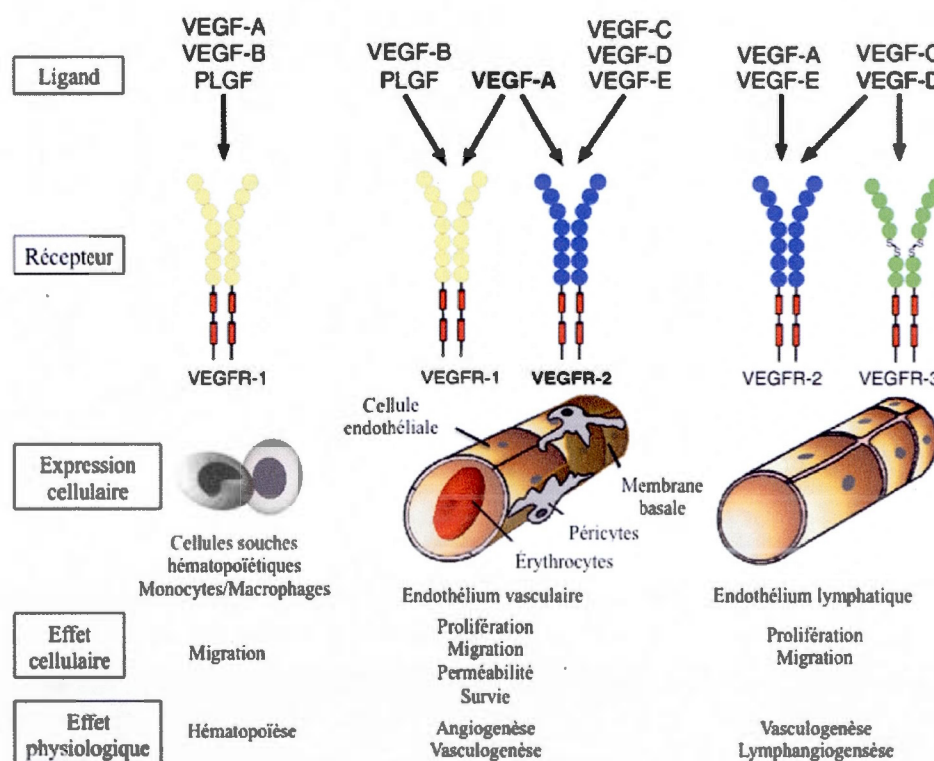


Figure 1.7 Représentation schématique des profils d'expression, de la spécificité des ligands et des effets cellulaires/physiologiques de chacun des VEGFR. Illustration modifiée de (Holmes *et al.*, 2007)

1.3.4 Structure du VEGFR-2

Les protéines kinases sont des enzymes qui transfèrent un groupement phosphate de l'ATP (adénosine triphosphate) vers une tyrosine, sérine ou thréonine de résidus ou molécules substrats. Ce sont des composantes essentielles des cascades de signalisation cellulaire incluant celles régulant l'angiogenèse. Les récepteurs tyrosines kinases tels le VEGFR-2 sont caractérisés par la présence de sept domaines extracellulaires et un domaine intracellulaire cytoplasmique avec une activité tyrosine kinase. Les domaines extracellulaires 2 et 3 sont responsables de la liaison du ligand; tandis que les domaines 4 à 7 sont responsables de la dimérisation du récepteur (Figure 1.8). La liaison du ligand au domaine extracellulaire de la tyrosine kinase cause la dimérisation du récepteur avec une phosphorylation subséquente des résidus tyrosines du domaine intracellulaire. Ceci résulte en un recrutement et une activation d'une série de protéines de signalisation intracellulaire nécessaires à l'angiogenèse tumorale. Le VEGFR-2 contient cinq sites majeurs d'autophosphorylation soient Y951 au niveau du domaine d'insertion de la kinase, Y1054 et 1059 au niveau du domaine kinase 2 ainsi que Y1175 et 1214 au niveau de la queue C-terminale. Le récepteur contient aussi quatre autres sites (Y1223, Y1305, Y1309, Y1319) dont les fonctions sont mal connues (Young et Reed, 2012).

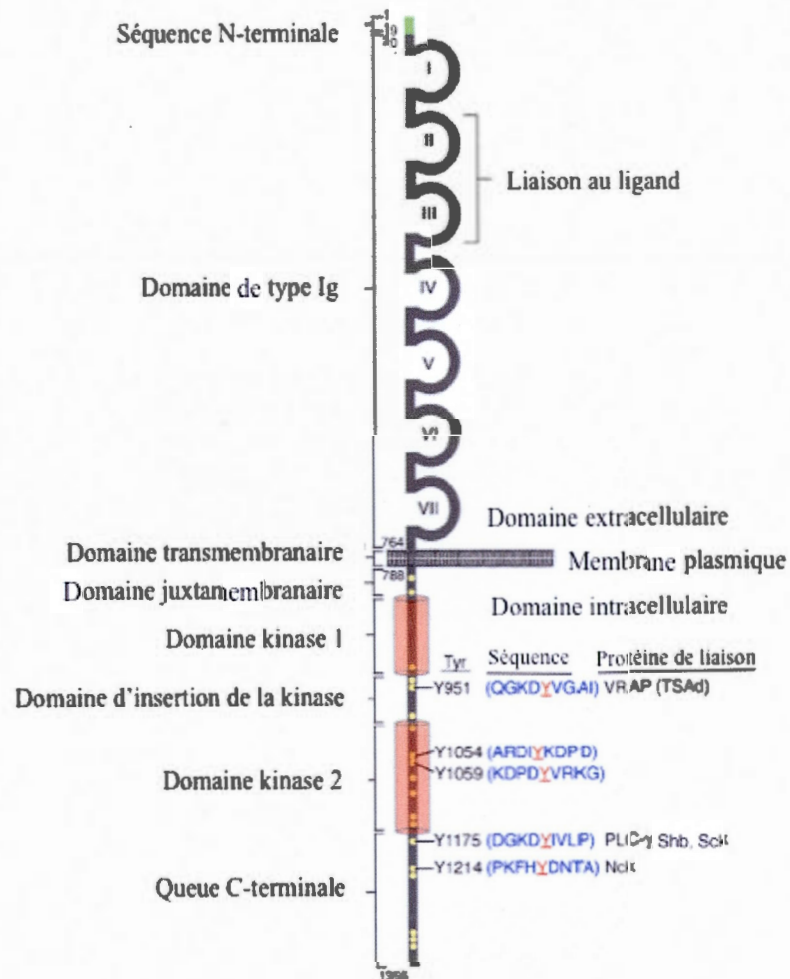


Figure 1.8 Structure d'un récepteur tyrosine kinase. (Holmes *et al.*, 2007)

1.3.5 Voies de signalisation cellulaire du VEGFR-2

L'activation du VEGFR-2 induit la survie des cellules endothéliales, leur prolifération, migration et invasion. En se liant au VEGFR-2, le VEGF-A cause la dimérisation du récepteur et une phosphorylation des résidus tyrosines (Young et Reed, 2012). La phosphorylation des tyrosines est strictement régulée par l'internalisation et la dégradation ou par la déphosphorylation médiée par les phosphotyrosines phosphatases (PTPs) (Koch et Claesson-Welsh, 2012).

1.3.5.1 Survie cellulaire

Sous conditions de stress, le VEGF se lie au VEGFR-2 qui active la voie de phosphatidyl inositol kinase (PI3-Kinase) et phosphoryle la protéine Akt/kinase B (PKB). Akt est une sérine kinase impliquée dans la survie cellulaire (Figure 1.9). Les récepteurs d'adhésion cellulaire, les intégrines telles que la molécule d'adhésion spécifique à l'endothélium $\alpha\beta_3$, jouent un rôle dans la transduction du signal du VEGF. La molécule d'adhésion cellulaire VE-cadhérine interagit avec le VEGFR-2 en formant un complexe avec β -caténine et PI3-Kinase pour induire la survie cellulaire (Byrne, Bouchier-Hayes et Harmey, 2005).

1.3.5.2 Migration cellulaire

Le VEGF est considéré comme un chimioattractant des cellules endothéliales jouant ainsi un rôle dans la migration et l'invasion. Le VEGF induit la migration cellulaire par la voie de PI3Kinase/Akt et active des facteurs tels que la kinase d'adhésion focale (FAK) et la paxilline. L'activation de FAK est médiée par la région c-terminale du VEGFR-2. La phosphorylation de Tyr951 active la protéine adaptatrice VRAP/TSAd (VEGF receptor-associated protein/T-cell specific adaptor) qui se lie avec la protéine tyrosine kinase proto-oncogène (Src) et favorise la migration des cellules endothéliales (Young et Reed, 2012). L'activation de la voie p38/MAPK est aussi impliquée dans la migration cellulaire (Figure 1.9). En plus des cellules endothéliales, le VEGF stimule la migration des cellules musculaires lisses vasculaires, des monocytes, des phagocytes mononucléaires et des cellules polymorphonucléaires. Aussi, le VEGF induit la migration et l'invasion de certaines cellules tumorales dans la leucémie et au cancer du sein. (Byrne, Bouchier-Hayes et Harmey, 2005).

1.3.5.3 Prolifération cellulaire

Le VEGFR-2 comme la plupart des récepteurs kinase induit la prolifération par la voie de signalisation ERK. VEGFR-2 stimule la phosphorylation de ERK en activant la phospholipase C- γ (PLC- γ). La phosphorylation de la Tyr1175, dans la partie c-terminale de VEGFR-2, permet la liaison du PLC- γ et sa phosphorylation menant à une augmentation de l'activité catalytique. La PLC- γ hydrolyse le phospholipide phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate membranaire (PIP₂) générant le diacyl glycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). La production d'IP₃ augmente la concentration intracellulaire du calcium tandis que le DAG est un activateur physiologique de la protéine kinase C (PKC) (Holmes *et al.*, 2007) (Figure 1.9).

1.3.5.4 Perméabilité cellulaire

Le VEGF-A a été initialement découvert comme étant un facteur de perméabilité vasculaire jouant un rôle dans les conditions physiologiques et pathologiques (Senger *et al.*, 1990). La perméabilité induite par le VEGF nécessite l'oxyde nitrique synthase (eNOS) qui génère l'oxyde nitrique (NO), un puissant vasodilatateur (Figure 1.9). En outre l'augmentation de perméabilité, le VEGF-A induit la vasodilatation qui augmente le flux sanguin vers les tissus. Cet effet hypotensif est régulé par le VEGFR-2 qui agit sur les cellules musculaires pour induire une relaxation (Holmes *et al.*, 2007).

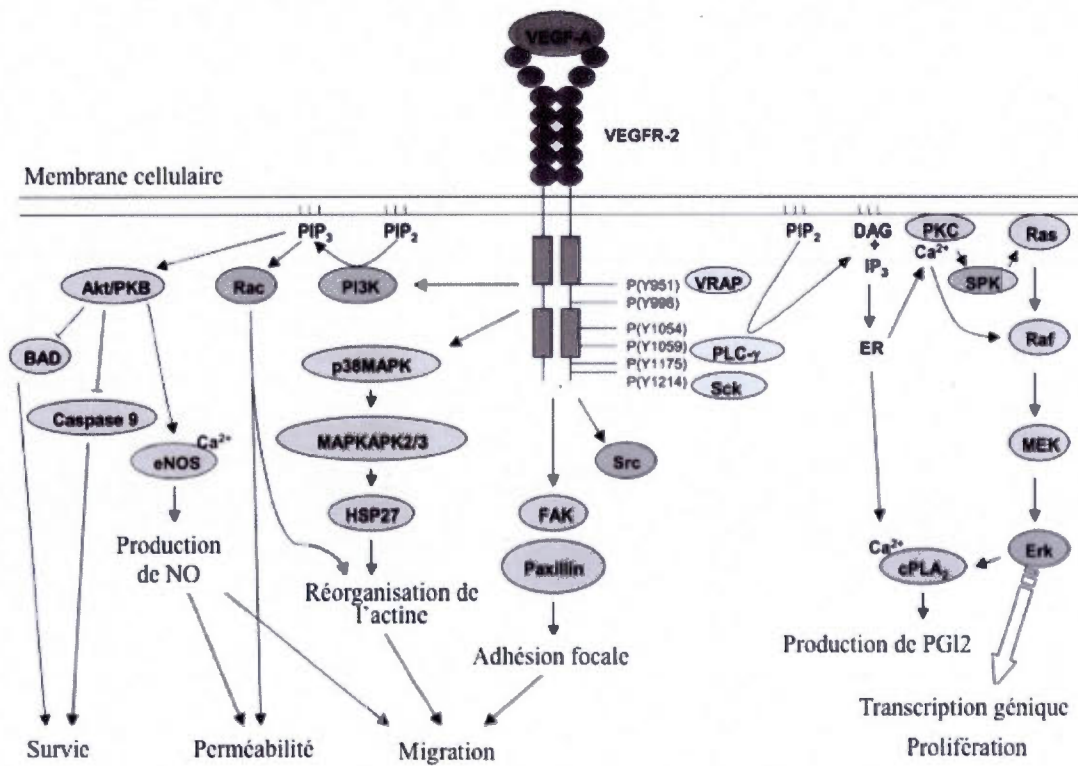


Figure 1.9 Illustration schématique de la transduction du signal par le VEGFR-2. La liaison du VEGFA au VEGFR-2 initie une cascade de signalisation cellulaire induisant la survie, la perméabilité, la migration et la prolifération cellulaire importantes à l'angiogenèse. Adaptée de (Hoebe *et al.*, 2004)

1.4 La nutrition et le cancer

La lutte contre le cancer est l'un des plus grands défis de l'humanité. Il a été estimé que 30-40% des tumeurs peuvent être évitées avec un style de vie adéquat et une meilleure diète. Certains facteurs alimentaires ont tendance à inhiber la cancérogenèse : les vitamines E et C, les polyphénols, les fibres et les acides gras insaturés. D'autres facteurs nutritionnels tels que les protéines et le chlorure de sodium et des comportements comme le tabagisme et la cuisson au gril ont tendance à favoriser le développement du cancer (Divisi *et al.*, 2006).

Malgré une meilleure compréhension du cancer et l'avancement dans la recherche du domaine des médicaments ciblés et de la prévention, le taux de guérison du cancer ne s'est pas amélioré. Certains types de cancers sont plus fréquents selon la culture des populations. Le cancer des poumons, du côlon, de la prostate et du sein sont communs dans les pays occidentaux. De façon similaire, le cancer de la tête et du cou sont plus répandus en Inde et celui de l'estomac au Japon. Le fait que les humains se ressemblent à 99,1% dans leurs séquences génétiques, la différence d'incidence des cancers n'est pas liée à la variation de la séquence nucléotidique de l'ADN (Divisi *et al.*, 2006). Cependant, des recherches estiment que 75-85% des maladies chroniques et autres maladies graves sont liées au mode de vie et ne peuvent être expliquées par la différence génétique (Wong, Gottesman et Petronis, 2005).

Des études épidémiologiques ont indiqué une relation entre les populations dont la diète est riche en fruits et légumes et où un faible taux d'incidence de cancers a été observé (Wong, Gottesman et Petronis, 2005). De plus, il a été estimé qu'un tiers des cancers est attribuable aux facteurs reliés à la nutrition et à l'activité physique (Wiseman, 2008). À cet égard, les molécules d'origine alimentaire sont considérées importantes dans la prévention des cancers. En effet, les fruits et légumes sont d'excellentes sources de fibres, de vitamines, de minéraux et contiennent aussi des composés phytochimiques tels que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes procurant des effets bénéfiques sur la santé. Les principales molécules phytochimiques ainsi que leurs cibles pharmacologiques sont résumées dans le Tableau 1.1. Ces molécules inhibent l'initiation de la cancérogenèse ainsi que les dernières étapes de l'angiogenèse et de la métastase (Aggarwal et Shishodia, 2006).

Ainsi, prévenir le cancer en bloquant le développement des cellules précancéreuses est important car même les personnes en bonne santé ont un certain nombre de tumeurs dormantes. De nos jours, la notion de prévention du développement des microtumeurs dormantes par la nutrition est clairement établie (Beliveau et Gingras, 2007).

Tableau 1.1
Cibles pharmacologiques des composés phytochimiques alimentaires
Tiré de (Beliveau et Gingras, 2007)

| Cibles | Molécules phytochimiques | Meilleures sources alimentaires |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| INHIBITION | | |
| Invasion tumorale et métastases | Épigallocatechine gallate | Thé vert |
| Signaux de transduction des récepteurs de facteurs de croissance | Delphinidine, acide éllagique | Bleuets, framboises, noix |
| Enzymes inflammatoires (ex : COX-2) | Curcumine, resvératrol | Curcuma, raisins |
| Activité des facteurs de transcription (ex : NFκB, AP-1) | Curcumine, resvératrol | Curcuma, raisins |
| Résistance aux médicaments (ex : MDRP) | Disulfure de diallyle | Ail |
| Angiogenèse | Epigallocatechine gallate | Thé vert |
| Action des oestrogènes | Génistéine | Soja |
| Activation métabolique des cancérogènes | Indol-3-carbinol | Chou |
| ACTIVATION | | |
| Apoptose tumorale | Phényle isothicyanate | Chou, cresson |
| Fonction du système immunitaire | Lentinane | Champignons shiitake |
| Détoxification via les enzymes de phase II | Sulforaphane | Brocoli |

Abréviations : Cox-2 : cyclooxygénase-2; AP-1 : protéine activatrice; MDRP : protéine de résistance aux médicaments.

1.4.1 Le régime méditerranéen et le cancer

La popularité et les bienfaits de la diète méditerranéenne sont attribuables aux multiples études épidémiologiques qui ont démontré une faible incidence de maladies cardiovasculaires et certains cancers dans le bassin méditerranéen; il a été suggéré que ceci était lié à la diète répandue dans cette région. Dans le passé, en plus de la faible consommation de viandes, l'accent a été mis sur le faible contenu en gras saturés et une proportion élevée de gras monoinsaturés de la diète méditerranéenne. Par la suite, l'emphase a été plutôt mise sur l'importance de la nutrition à base de plantes et une consommation régulière d'huile d'olive (Casaburi *et al.*, 2013). Le régime méditerranéen riche en fruits, légumes, fibres, poissons et huile d'olive représente un régime santé et préventif. L'effet préventif consiste en la chimioprotection, mais aussi en une réduction de la mortalité due aux maladies cardiovasculaires (Owen *et al.*, 2000a). Plusieurs données suggèrent que les composants de l'huile d'olive jouent un rôle important dans la prévention de ces maladies (Braga *et al.*, 1998).

L'huile d'olive fait partie intégrante de la diète des populations méditerranéennes. Malgré la différence du régime de chaque région, l'utilisation de l'huile d'olive comme composant majeur dans la diète est un point commun (Trichopoulou et Lagiou, 1997). L'effet bénéfique de la diète méditerranéenne et de l'huile d'olive sur la santé et la longévité en général a été lié à la teneur élevée en composants antioxydants qui sont abondamment présents dans les aliments d'origine végétale, le vin rouge et particulièrement l'huile d'olive vierge. Les différents constituants de cette dernière sont impliqués dans la protection de stabilité d'oxydation de l'huile d'olive et la préservation de l'homéostasie. Les antioxydants présents dans l'huile d'olive sont énumérés dans le Tableau 1.2. Les propriétés bénéfiques de l'huile d'olive ont été attribuées à sa teneur en antioxydants, mais aussi en acides gras insaturés (Trichopoulou et Dilis, 2007).

Tableau 1.2
Composants à activité antioxydante de l'huile d'olive
Tiré de (Trichopoulou et Dilis, 2007)

| Classes chimiques | Sous-classes | Composants |
|-------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Composants phénoliques | Acides phénoliques | Acide 4-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide gallique, acide vanillique, acide syringique, acide 4-hydroxyphénylacétique, acide homovanillique, acide o-coumarique, acide p-coumarique, acide caféique, acide férulique, acide sinapique |
| | Alcools phénoliques | Tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropéine, aglycone oleuropéine, forme dialdéhyde du aglycone oleuropéine, forme décarboxyméthyl du aglycone oleuropéine, aglycone ligstroside |
| | Lignanes | (+)-1-pinorésinol, (+)-1-acétoxy-pinorésinol |
| | Flavonoïdes | Apigénine, lutéoline, quercitine |
| | Composés non-phénoliques étroitement liés | Acide élénolique, acide cinnamique |
| Hydrocarbures | Triterpènes | Squalène |
| Chlorophylles | Chlorophylle et dérivés | Phéophytine α , b phéophytine, chlorophylle α , chlorophylleII b, pyropheophytine α |
| Caroténoïdes | Carotènes | β -Carotène |
| | Xanthophylles | Lutéine, néoxanthine, violaxanthine, luteoxanthine, anthéraxanthine, mutatoxanthine, β -cryptoxanthine |
| Tocophérols | - | α , β , γ et δ -Tocophérol |

Une récente étude a également démontré qu'une adhésion à une diète méditerranéenne est liée à une réduction d'incidence de maladies cérébrovasculaires et de mortalité (Misirli *et al.*, 2012). Une autre étude a démontré que la consommation d'huile d'olive durant la vie d'adulte ne réduit pas le risque de cancer du sein; cependant, elle affecte les récepteurs hormonaux des tumeurs (Buckland *et al.*, 2012). Notons ici que l'étude concernait l'huile d'olive régulière et non la vierge ou l'extra vierge. La différence la plus importante dans les propriétés biologiques de l'huile d'olive consiste dans la méthode d'extraction de l'huile d'olive et le processus de production (Casaburi *et al.*, 2013).

1.4.2 Quelques composants de l'huile d'olive et leurs effets bénéfiques pour la santé

La concentration en polyphénols dans l'huile d'olive varie entre 50 et 800 mg/kg. Cette variabilité dépend de plusieurs facteurs tels que les conditions climatiques, l'environnement (rayonnement ultraviolet et température) et le moyen de production et de stockage de l'huile. En général, les plus hautes concentrations en composés phénoliques retrouvés dans l'huile d'olive et reconnus pour leurs propriétés anticancéreuses sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine (Casaburi *et al.*, 2013). Les composants phénoliques simples présents dans l'huile d'olive sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides phénoliques tels que l'acide vanillique et l'acide caféique (Casaburi *et al.*, 2013). L'hydroxytyrosol, principal composant de l'huile d'olive, est un puissant antioxydant ayant la capacité d'inhiber l'oxydation des LDL (lipoprotéines de basse densité), l'agrégation plaquettaire et protège contre les dommages causés à l'ADN (Visioli, Poli et Gall, 2002). Cette molécule est capable de réduire la synthèse des prostaglandines E2 en bloquant la transcription de la Cox-2 et de la 5-lipoxygénase réduisant par ce fait, l'influence chronique associée à certaines maladies tel le cancer. Dans les cellules de la kératine humaines, l'hydroxytyrosol réduit la viabilité cellulaire, induit l'apoptose et régule, à la baisse, les gènes associés à l'inflammation, aux systèmes antioxydants et aux facteurs de transcription (Rafehi *et al.*, 2012). Ce polyphénol pourrait contribuer à la prévention du cancer, car il réduit le stress oxydatif et protège l'oxydation de l'ADN dans les cellules normales du sein à des concentrations physiologiques (Warleta *et al.*, 2011).

L'autre composant phénolique simple est le tyrosol. Celui-ci a été décrit comme un faible antioxydant, car des concentrations pharmacologiques sont nécessaires pour réduire le stress oxydatif et ne peut protéger les cellules mammaires contre le dommage oxydatif de l'ADN (Warleta *et al.*, 2011). Cependant, une étude a démontré que cette molécule est apte à inhiber l'oxydation des LDL dans les cellules Caco2 ainsi que le relâchement des cytokines par les monocytes humains (Warleta *et al.*, 2011).

La taxifoline, appartenant à la famille des flavonoïdes, est un autre composant important de l'huile d'olive; celui-ci exerce son effet chimiopréventif par l'activation des ARE (élément de réponse antioxydante) et régule les gènes liés au cancer incluant ceux impliqués dans la détoxification hépatique, l'antioxydation, le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire tel que démontré par la méthode des puces à ADN (Lee *et al.*, 2007).

L'huile d'olive contient aussi des composés phénoliques complexes : les esters de tyrosol, d'hydroxytyrosol ainsi que l'oleuropéine. L'oleuropéine, principal composé des olives, est le composant qui donne un goût amer aux olives. Dans les cellules de cancer du sein, l'oleuropéine déclenche l'apoptose via la voie mitochondriale et inhibe la prolifération en retardant la phase S du cycle cellulaire (Elamin *et al.*, 2013). L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol réduisent la formation de structures capillaires sur matrigel ainsi que la migration des cellules endothéliales via l'inhibition de MMP-9 et COX-2 justifiant leur rôle protecteur dans l'athérosclérose vasculaire et le cancer (Scoditti *et al.*, 2012).

Il a été démontré que l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine et le tyrosol sont de puissants antioxydants aux propriétés anti-inflammatoires et antithrombotiques. Tous ces effets suggèrent des propriétés anticancéreuses en affectant des voies de signalisation menant à l'inhibition de la prolifération et à l'induction de l'apoptose, *in vitro*, dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (Casaburi *et al.*, 2013). En outre les composés phénoliques, l'huile d'olive contient des acides gras insaturés dont l'acide oléique qui possède un effet préventif des maladies malignes telles que le cancer du côlon et celui du sein (Fistonic *et al.*, 2012).

1.5 Hypothèse et objectifs

Les études épidémiologiques ont pu établir une relation étroite entre le régime méditerranéen et une faible incidence de plusieurs types de cancer. Cet effet protecteur revient, entre autres, à l'utilisation importante de l'huile d'olive dans la diète (Trichopoulou et Dilis, 2007). Toutefois, la contribution ainsi que les mécanismes d'action antiangiogéniques des différents composés de l'huile d'olive demeurent encore inexpliqués. C'est dans ce contexte que nous avons tenté d'évaluer les propriétés antiangiogéniques de certaines molécules d'huile d'olive pouvant être utilisées dans la prévention des cancers.

Nous émettons l'hypothèse que les principales molécules présentes dans l'huile d'olive possèdent des propriétés antiangiogéniques. Pour vérifier cela, l'effet de cinq composants majeurs de l'huile d'olive (hydroxytyrosol (HT), taxifoline (Tax), tyrosol (TyrOH), oleuropéine (OL) et acide oléique (AO)) (Figure 1.10) a été examiné *in vitro* sur l'angiogenèse modulée par le VEGF.

Les objectifs de ce projet consistent à comparer et caractériser les effets ainsi que le mode d'action des composés de l'huile d'olive sur les étapes clefs de l'angiogenèse (prolifération, migration et tubulogenèse) induites par le VEGF dans les cellules humaines endothéliales de veine ombilicales (HUVECs).

Nous avons vérifié le potentiel des molécules d'huile d'olive sur la migration et la prolifération des HUVECs ainsi que la formation de structures capillaires sur matrigel (tubulogenèse). Afin de s'assurer que les effets observés n'étaient pas dus à la toxicité des molécules étudiées, nous avons aussi analysé la viabilité cellulaire.

Dans un contexte de thérapie antiangiogénique, le récepteur à activité tyrosine kinase VEGFR-2 est une cible importante dû à son rôle dans les étapes de l'angiogenèse tumorale. Nous avons donc caractérisé le mécanisme de chacun de ces composés sur le VEGFR-2. Pour ce faire, nous avons analysé les effets de HT, Tax, TyrOH, OL et AO sur la phosphorylation des quatre résidus tyrosines majeurs du VEGFR-2 impliqués dans la signalisation

CHAPITRE II

ARTICLE

Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation

Sylvie Lamy*, Amira Ouanouki*, Richard Béliveau and Richard R. Desrosiers

*Auteurs équivalents

L'article qui suit a été soumis pour publication au journal "Cancer Prevention Research" le 20 mars 2013. Le numéro de soumission est CAPR-13-0105.

L'accusé de réception de cet article est présenté dans la partie Annexes (Annexe-1).

La réalisation des expériences, l'analyse et l'interprétation des résultats, la participation à la rédaction ainsi que la recherche bibliographique sont des tâches que j'ai réalisées.

Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation

Sylvie Lamy^{1,2,*,\$}, Amira Ouanouki^{2,\$}, Richard Béliveau² and Richard R. Desrosiers²

Authors' Affiliation: ¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, ²Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Running title: Olive oil compounds inhibit VEGFR-2 phosphorylation

Keywords: Angiogenesis; endothelial cell; olive oil; signaling pathway; VEGF/VEGFR-2

Financial support: This study was fund by the Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment from Université du Québec à Montréal (UQÀM)

***Corresponding Author:** Sylvie Lamy, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Phone: +1 (514) 987-3000x0317; FAX: +1 (514) 987-0246; E-mail: lamy.sylvie@uqam.ca

^{\$}These authors contributed equally to this work

Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation

Sylvie Lamy^{1,2,*,\$}, Amira Ouanouki^{2,\$}, Richard Béliveau² and Richard R. Desrosiers²

Abstract: 244 words

Text (include figure legends): 4392 words

References: 50

Figures: 5

Table: 1

Abbreviations: EC, endothelial cell; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; HT, Hydroxytyrosol; HMVEC, human dermal microvascular endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OA, Oleic acid; OL, Oleuropein; Tax; TyrOH, Tyrosol; VEGF; vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

Résumé de l'article

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire déclenche des processus de signalisations cruciaux qui régulent l'angiogenèse tumorale et représente donc une cible intéressante pour le développement de nouveaux traitements anticancéreux. Plusieurs études épidémiologiques ont confirmé que la consommation abondante d'aliments d'origine végétale est associée à un faible risque de développement du cancer. Dans le bassin méditerranéen, la consommation de l'huile d'olive extra vierge constitue une part importante de l'alimentation de la population locale. Comparativement à d'autres huiles végétales, l'huile d'olive contient plusieurs anti-oxydants phénoliques qui préviennent l'apparition d'une variété de processus pathologiques tels que le cancer. Alors que le fort potentiel antioxydant de ces molécules est bien caractérisé, leurs activités anti-angiogéniques restent inconnues. Le but de cette étude est de déterminer si le tyrosol (TyrOH), l'hydroxytyrosol (HT), le taxifolin (Tax), l'oléuropéine (OL) et l'acide oléique (AO), cinq composés contenus dans l'huile d'olive extra vierge, peuvent affecter l'angiogenèse *in vitro*. Nous avons démontré que HT, Tax et AO sont de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'angiogenèse affectant les sites d'autophosphorylation spécifiques du VEGFR-2 (Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 et Tyr1214) et menant au blocage de la signalisation dans les cellules endothéliales (CE). L'inhibition de VEGFR-2 par les composés de l'huile d'olive réduit de façon significative la prolifération et la migration des CE induites par le VEGF ainsi que leur différenciation en structures capillaires dans le Matrigel. Ces résultats mettent en évidence les propriétés chimio-préventives de l'huile d'olive et soulignent l'importance de la nutrition dans la prévention du cancer.

2.1 Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF) triggers crucial signaling processes that regulate tumor angiogenesis and, therefore, represents an attractive target for the development of novel anticancer therapeutics. Several epidemiological studies have confirmed that abundant consumption of foods from plant origin is associated with reduced risk of developing cancers. In the Mediterranean basin, the consumption of extra virgin olive oil is an important constituent of the diet. Compared to other vegetable oils, the presence of several phenolic antioxidants in olive oil is believed to prevent the occurrence of a variety of pathological processes, such as cancer. While the strong antioxidant potential of these molecules is well characterized, their antiangiogenic activities remain unknown. The aim of this study is to investigate whether tyrosol (TyrOH), hydroxytyrosol (HT), taxifolin (Tax), oleuropein (OL) and oleic acid (OA), five compounds contained in extra virgin olive oil, can affect *in vitro* angiogenesis. We found that HT, Tax and OA were the most potent angiogenesis inhibitors through their inhibitory effect on specific autophosphorylation sites of VEGFR-2 (Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 and Tyr1214) leading to the inhibition of endothelial cell (EC) signaling. Inhibition of VEGFR-2 by these olive oil compounds significantly reduced VEGF-induced EC proliferation and migration as well as their morphogenic differentiation into capillary-like tubular structures in Matrigel. Our study demonstrates that HT, Tax and OA are novel and potent inhibitors of the VEGFR-2 signaling pathway. These findings emphasize the chemopreventive properties of olive oil and highlight the importance of nutrition in cancer prevention.

2.2 Introduction

Tumor angiogenesis is a critical step by which tumor cells stimulate the formation of new blood capillaries from existing vessels that sustain the development of cancer by providing oxygen and nutrients to tumor cells (Folkman, 2006). This neovascularization occurs through a series of steps, including stimulation of endothelial cells (ECs) by autocrine and/or paracrine growth factors, proteolytic degradation of the basement membrane and surrounding extracellular matrix, EC migration and proliferation, and morphological differentiation/reorganization of ECs into a three-dimensional tubular structure (Liekens, De Clercq et Neyts, 2001). Vascular endothelial growth factor (VEGF), a major factor secreted by tumor cells, plays an important role in the expansion of the microvascular network (Ferrara, 2009 ; Folkman et Shing, 1992). It is a specific EC mitogen that binds with high affinity to the EC receptors VEGF receptor-1 (VEGFR-1, Flt-1) and VEGF receptor-2 (VEGFR-2, Flk-1, KDR), the latter being responsible for most of the mitogenic and chemotactic effects of VEGF (Cross *et al.*, 2003). Therefore, the binding of VEGF to VEGFR-2 activates the intrinsic VEGFR-2 tyrosine kinase activity required for EC migration, proliferation and survival of vascular ECs (Holmes *et al.*, 2007). To date, five major autophosphorylation sites within VEGFR-2 have been documented. Tyr951 lies in the kinase-insert domain (Matsumoto *et al.*, 2005), Tyr1054 and Tyr1059 are in the kinase domain and are critical for the catalytic activity of the receptor (Dougher et Terman, 1999 ; Kendall *et al.*, 1999), while Tyr1175 and Tyr1214 are in the C-terminal tail (Takahashi *et al.*, 2001). Since VEGF regulates angiogenesis, targeting new vessel growth via the inhibition of VEGF-VEGFR-2 kinase axis therefore represents a promising strategy for cancer chemoprevention and therapy (Bhat et Singh, 2008 ; Underiner, Ruggeri et Gingrich, 2004).

In the last couple of years, several studies linked abundant consumption of foods from plant origin with decreased risk of developing various cancers (Wiseman, 2008). It is now well established that the Mediterranean diet represents a model of healthy eating and is associated with a favourable health status, a better quality of life, and a decreased incidence of mortality from cardiovascular diseases, chronic degenerative diseases and cancers (Pelucchi *et al.*, 2011 ; Sofi *et al.*, 2010 ; Verberne *et al.*, 2010). These beneficial effects have

partially been explained by the consumption of virgin olive oil (Cicerale *et al.*, 2009 ; Filik et Ozyilkan, 2003), which has been reported to be more beneficial than any other dietary lipids against cancer such as colorectal, prostate, lung, endometrial and breast cancers (Escrich *et al.*, 2007 ; Pauwels, 2011 ; Trichopoulou *et al.*, 2000 ; Verberne *et al.*, 2010). The healthful properties of olive oil can in particular be attributed not only to the high relationship between unsaturated and saturated fatty acids but also to the antioxidant and anti-inflammatory properties of its phenolic compounds (Rafehi, Ververis et Karagiannis, 2012). The main groups among these phenolic compounds are phenolic acids, phenolic alcohols, flavonoids, secoiridoids and lignans, which confer some of the anticancer effects observed in both epidemiological and experimental studies (Bendini *et al.*, 2007 ; Charoenprasert et Mitchell, 2012 ; Kontou *et al.*, 2011). Indeed, it has been reported that hydroxytyrosol, a phenolic alcohol, inhibits proliferation of both human promyelocytic leukaemia cells (HL60) and colon adenocarcinoma cells (HT29) (Fabiani *et al.*, 2002). Moreover, hydroxytyrosol and oleuropein, a secoiridoid, were found to reduce cell viability, inhibit cell proliferation, and induce cell apoptosis in human breast cancer cells (MCF-7) (Han *et al.*, 2009). Recently, Scoditti et al. (Scoditti *et al.*, 2012) demonstrated that these compounds reduce inflammatory angiogenesis through the metalloproteinase (MMP)-9 and the proinflammatory enzyme cyclooxygenase (COX)-2 in human vascular ECs.

The aim of the present study was to investigate and compare the effect of four phenolic compounds (hydroxytyrosol, HT; oleuropein, OL; Taxifolin, Tax; Tyrosol, TyrOH) and a monounsaturated fatty acid, oleic acid (OA) on EC functions essential for angiogenesis. Since the mechanisms underlying the inhibition of neovascularization by olive oil compounds remain to be established, this prompted us to investigate whether these specific compounds affect VEGF-induced angiogenesis. We observed that olive oil compounds inhibited EC proliferation and migration induced by VEGF as well as their morphogenic differentiation into capillary-like structures through the inhibition of the VEGFR-2/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways.

2.3 Materials and methods

Materials

Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON) and serum was purchased from HyClone Laboratories (Logan, UT). Matrigel basement membrane matrix growth factor reduced was obtained from Becton Dickinson Labware (Bedford, MA). Hydroxytyrosol, oleic acid, oleuropein, (+)-taxifolin and tyrosol, were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Human recombinant VEGF was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The anti-ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) (K-23) polyclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies for VEGF receptor-2, the stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase (SAPK/JNK) and anti-phospho-VEGF receptor-2 (Tyr951), anti-phospho-VEGF receptor-2 (Tyr1059), anti-phospho-VEGF receptor-2 (Tyr1175), anti-phospho-VEGF receptor-2 (Tyr1214), anti-phospho- SAPK/JNK polyclonal antibodies and anti-phospho-p44/42 MAPK monoclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Thermo Scientific (Rockford, IL). All other reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human dermal microvascular endothelial cells (HMVECs-d-Ad) were purchased from Clonetics (San Diego, CA). Cells were maintained in EC basal medium-2 (EBM-2; Lonza, Walkersville, MD) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) for HUVECs and 5% FBS for HMVECs and with EGM-2 growth factor mixture (Lonza). Cells used in this study were restricted to use between passage 3 and 6. They were cultured at 37°C under a humidified 95%–5% (v/v) mixture of air

and CO₂. Cells were treated with vehicle (0.1% ethanol) or with olive oil compounds and stimulated with VEGF.

Endothelial cell tube formation assays

The formation of capillary-like structures was assessed on growth factor reduced (GFR) Matrigel (7.85 mg/mL). Matrigel was thawed at 4 °C, and 50 mL were quickly added to each well of a 96-well plate and allowed to solidify for 10 min at 37 °C. The wells were then incubated for 6 h at 37 °C with HUVECs (20 000 cells/well), which had previously been treated for 18 h with 50 mM olive oil compounds in EBM-2 containing 1% FBS. VEGF was added to the cells at 1 mg/mL. Tube formation was monitored by an inverted phase contrast microscopy (Nikon Eclipse TE2000-U microscope) and pictures (×60 magnification) were taken using a Retiga 1300 camera. The extent to which capillary-like structures formed in the gel was quantified by analysis of digitized images to determine the thread length of the capillary-like network, using ImageJ software (NIH).

Cell proliferation and migration assay using the xCelligence Biosensor system

Experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyser (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument, the xCELLigence system (Roche Diagnostics, QC). This system was used according to the instructions of the supplier. Firstly, the optimal seeding concentration of cells and VEGF concentration for proliferation and migration assays, were determined. For cell proliferation assay, HUVECs were seeded at 5,000 cells/well in 200 µL complete medium into an E-plate 16, specifically designed to measure cellular impedance (Roche Diagnostics), and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 h. Then, cells were incubated with serum-free medium containing VEGF (25 ng/mL) or olive oil compounds for 35 h. Cell proliferation was monitored every 15 min. For cell viability, HUVECS were treated in the same conditions and viability quantified using the NucleoCounter® NC-100 device (Mandel Scientific Compagny Inc., ON) as described by the manufacturer's instructions (ChemoMetect). For cell migration assay, HUVECs were serum-starved in 1% FBS for 24 h. Then, cells (50,000 cells/well) were seeded in EBM-2 into a CIM-Plates 16 (Roche diagnostics). These plates are similar to conventional Transwells

(8- μ m pore size) with gold electrode arrays on the bottom side of the membrane, which provide a real-time measurement of cell migration. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber was coated with 25 mL of 0.15% gelatin in phosphate buffered saline (PBS) and incubated for 1 h at 37°C. The lower chamber was filled with serum-free medium containing VEGF (50 ng/mL) or olive oil compounds. The upper chamber of each well was filled with 100 μ L of HUVECs (5×10^5 cells/mL). After 30 min of adhesion, cell migration was monitored every 5 min for 18 h. The impedance value was measured by the RTCA DP Instrument and was expressed as an arbitrary unit called the Cell Index. Each experiment was performed in quadruplicate wells.

Western blot analysis

Following treatment with olive oil compounds for 24 h in 1% FBS, HUVECs or HMVECs were stimulated with VEGF (50 ng/mL). To study the effect of these compounds on the VEGFR-2 phosphorylation or VEGF signaling pathway, VEGF was added to the cells for 2 min or 10 min, respectively. Cells were then washed once with ice-cold PBS containing 1 mM each of NaF and Na_3VO_4 and were incubated in the same medium for 30 min at 4°C. The cells were solubilized on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.5% (vol/vol) Nonidet P-40 and 1% (vol/vol) Triton X-100]. The resulting lysates (25 - 50 μ g protein) were solubilized in Laemmli sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, and 0.00125% bromophenol blue], boiled for 4 min, and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes which were then blocked overnight at 4°C with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline/Tween 20 (TBS-T; 147 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20). Membranes were further washed in TBS-T and incubated with the primary antibody in TBS-T containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% sodium azide, followed by a 1 h incubation with HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies in TBS-T containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized with an ECL detection system. The immunoreactive bands were quantified with ImageJ software (NIH).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using 1-way ANOVA with a post hoc Dunnett's test. Differences with $P < 0.05$ were considered significant.

2.4 Results

Olive oil compounds inhibit VEGF-induced tube formation of endothelial cells

In order to determine whether olive oil compounds affect angiogenesis, we compared the effect of five olive oil compounds (HT, OA, OL, Tax, TyrOH) (Fig. 2.1A) on the morphological differentiation capacity of ECs into capillary-like structures. Tubulogenesis was investigated using GFR Matrigel, in which the levels of cytokines and growth factors have been markedly reduced compared to the standard Matrigel. This basement membrane matrix is suitable to study the induction of tubule elongation of ECs in response to specific angiogenic factor. For our assay, we added exogenous VEGF (1 $\mu\text{g/mL}$) to induce robust tube-like structures (Fig. 2.1B). Treatment of HUVECs with 50 μM of the compounds for 24 h, prior to seeding on top of Matrigel, significantly abrogated tube formation in OL, HT, Tax and OA conditions. The length of endothelial tubular structures were reduced by 9.3%, 17%, 58.4% and 74%, respectively. However, TyrOH did not affect the formation of capillary-like structures.

Olive oil compounds inhibit VEGF-induced proliferation of endothelial cells

In response to angiogenic stimuli, ECs proliferate, migrate, and form vascular tube networks. To determine the effect of olive oil compounds on proliferation of HUVECs, the xCELLigence system, a real-time cell proliferation, viability and cytotoxicity analyzer, was conducted. The assay involved exposing cells to 0 – 50 μM of olive oil compounds in the presence of VEGF. The cell-electrode impedance response generated from the interaction of cells with electronic biosensors was used to derive the cell index, representing growth over time (Fig. 2.2C-E). At 50 μM for 24 h, Tax, OA and HT inhibited EC proliferation by 16% for Tax, 23% for HT and 62% for OA (Fig. 2.2A) without significant toxicity (Fig. 2.2B). These inhibitions occurred in a concentration- and time-dependent manner (Fig. 2.2C-E). In order to determine a half-maximal inhibition (IC_{50}) of these compounds, cells were also treated with higher concentrations (100-200 μM) (data not shown). The inhibitory potency of HT, Tax and OA toward VEGF-induced EC proliferation was significantly different, with IC_{50} values being observed at concentrations of 60 μM for HT (Fig. 2.2D), 41 μM for Tax (Fig. 2.2C) and 22 μM for OA (Fig. 2.2E).

Olive oil compounds inhibit VEGF-induced migration of endothelial cells

To assess the effect of olive oil compounds on the chemotactic motility of HUVECs, we measured their migration by the xCELLigence system. After 18 h of olive oil compounds treatment at 50 μ M, VEGF-induced HUVECs migration was significantly inhibited by 28% for OL, 46% for Tax, 58% for OA and 59% for HT (Fig. 2.3A). We further studied these inhibition effects for the three best potent compounds, and the results showed that Tax, OA and HT caused a concentration- and time-dependent inhibition of cell migration in the presence of VEGF with IC_{50} values of 50 μ M, 34 μ M and 28 μ M, respectively (Fig. 2.3B-D).

Hydroxytyrosol, taxifolin and oleic acid inhibit VEGF-induced tyrosine phosphorylation of VEGFR-2

To achieve a better understanding of how olive oil compounds affected the molecular mechanisms involved in the inhibition of growth, migration and vascular tube formation, we next explored their inhibition effects on signaling through the VEGF/VEGFR-2 axis, which is already known to mediate angiogenesis in ECs. VEGF induces the dimerization of VEGFR-2 that leads to receptor autophosphorylation on several tyrosine residues and activation (Koch *et al.*, 2011). Failure in the phosphorylation of one of these tyrosine residues could alter the kinase activity of VEGFR-2 or downstream signaling pathways. Quiescent HUVECs were incubated for 24 h in EBM-2 medium containing 1% FBS in the presence or absence of olive oil compounds and then, stimulated with VEGF for 2 min. Protein expression and extent of phosphorylation of tyrosine residues Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 and Tyr1214 were assessed by immunoblotting. As shown in Fig. 2.4A, olive oil compounds affected the relative levels of phosphorylation of specific tyrosine amino acid residues, as determined by the ratio of phosphorylated to unphosphorylated proteins forms of VEGFR-2. Blotting of membranes with an antibody against VEGFR-2 showed that olive oil compounds did not affect the amount of VEGFR-2 in cell lysates. These results showed that HT, Tax and OA were potent inhibitors of VEGF-induced tyrosine phosphorylation of VEGFR-2. Thus, we further analyzed the inhibitory effect of the most potent inhibitors and we observed that Tax, OA and HT caused a concentration-dependent inhibition of VEGF-induced tyrosine residues phosphorylation (Fig. 2.4B-D). Effectively, the phosphorylation of Tyr951, Tyr1059,

Tyr1175 and Tyr1214 were inhibited with an IC_{50} at concentrations of 23 – 33 μ M for Tax, 10 – 50 μ M for OA, and 7 – 30 μ M for HT (Table 2.1). These values indicate that certain olive oil compounds could efficiently interfere with the signaling activity of VEGFR-2 in HUVECs.

Hydroxytyrosol, taxifolin and oleic acid inhibit VEGF-mediated signaling pathways in endothelial cells

To further investigate the mechanisms involved in the inhibitory actions of Tax, OA and HT on the VEGFR-2 signaling pathway, we next examined whether these olive oil compounds affected the phosphorylation of several downstream substrates involved in angiogenesis, such as ERK-1/2 (Holmes *et al.*, 2007) and SAPK/JNK (Shen *et al.*, 2012). Quiescent HUVECs were incubated for 24 h in EBM-2 medium containing 1% FBS in the presence or absence of olive oil compounds and then, stimulated with VEGF for 10 min. Treatment with these compounds resulted in a concentration-dependent inhibition of the VEGF-induced tyrosine phosphorylation of ERK-1/2 and SAPK/JNK (Fig. 2.5A-C). For all these treatments, the IC_{50} values obtained for pERK-1/2 were very close (ranging from 21 to 27 μ M) comparatively for those obtained for pSAPK/JNK (varying from 10 to 28 μ M) (Table 2.1). For both signaling pathways, pERK-1/2 and pSAPK/JNK, HT was the most potent inhibitor followed by OA then Tax (Table 2.1 and Fig. 2.5 A-C). In order to strengthen these results observed in HUVECs, we next investigated whether HT, Tax and OA were also capable of inhibiting VEGF-induced tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 and downstream signaling in microvascular ECs, HMVECs (Fig. 2.5D). We found that HT inhibited the phosphorylation of all tyrosine residues (Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 and Tyr1214) as well as ERK-1/2 and SAPK/JNK. For Tax, the inhibition was observed at Tyr1059 while OA inhibited both Tyr951 and Tyr1059 phosphorylation. For these two compounds, SAPK/JNK activation was inhibited but not for ERK. Overall, these results show that HT is the most effective olive oil compound inhibiting VEGF-induced *in vitro* angiogenesis.

2.5 Discussion

VEGF has emerged as an attractive target in antiangiogenesis treatment strategies (Niu et Chen, 2010 ; Underiner, Ruggeri et Gingrich, 2004). However, the chronic therapeutic use of anti-VEGF agents is limited due to significant side effects in some patients (Kamba et McDonald, 2007). Therefore, in the last few years, major efforts have focused on identifying naturally occurring VEGF inhibitors as chemopreventive agents, which will not significantly alter quality of life, is inexpensive, safe, well tolerated, and effective (Bhat et Singh, 2008). In this respect, we have demonstrated that EGCG from green tea (Lamy, Gingras et Beliveau, 2002), delphinidin from berries (Lamy *et al.*, 2006) and apigenin from parsley (Lamy *et al.*, 2008b) are potent VEGF signaling inhibitors. Several studies have shown that the presence of phenolic antioxidants in olive oils could also prevent the occurrence of a variety of pathological processes, including the development of cancer (Filik et Ozyilkan, 2003 ; Owen *et al.*, 2000b ; Rafehi, Ververis et Karagiannis, 2012). While the strong antioxidant potential of these molecules is well characterized, their antiangiogenic activity remains unknown. Recently, it has been reported that HT affected tumor growth and tumor-associated angiogenesis in a HT-29 (colon cancer cells) xenograft model through the downregulation of hypoxia inducible factor-1, VEGF, and microsomal prostaglandin-E synthase-1 (Terzuoli *et al.*, 2010). Moreover, Yuan et al. (Yuan, Ahn et Davis, 2007 ; Yuan, Yoshida et Davis, 2006) demonstrated that an ethanolic extract of dried shark muscle mixed with olive oil interfered with VEGF binding to VEGFRs. These results prompted us to further investigate olive oil compounds as a diet-derived source of anti-VEGF agents. The central findings of the current study are that we demonstrate that specific olive oil compounds, such as Tax, OA and HT block VEGF-induced angiogenesis, by inhibiting ECs growth and migration as well as tubulogenesis.

The potential mechanisms behind these inhibitory effects in HUVECs could be attributed to the inhibition of VEGF-induced tyrosine phosphorylation of VEGFR-2, leading to the inhibition of cellular signaling triggered by this receptor. Here, we showed that Tax, OA and HT effectively inhibit VEGF-dependent tyrosine phosphorylation of the VEGFR-2 in a concentration-dependent manner and that this inhibitory effect is associated with an impairment of downstream signaling events triggered by VEGFR-2, such as phosphorylation

of p42/p44 MAPK (ERK-1/2), and p46/p54 SAPK/JNK. Moreover, these olive oil compounds exert their effect through the phosphorylation of precise tyrosine residues on the cytoplasmic portion of VEGFR-2. Our data revealed that Tax, OA and HT inhibited the major autophosphorylation sites on VEGFR-2 in HUVECs, such as Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 and Tyr1214. Interestingly, failure in the phosphorylation of one of these tyrosine residues and/or that of ERK-1/2 or SAPK/JNK pathways has been proven to alter EC migration and proliferation (Holmes *et al.*, 2007 ; Katz, Amit et Yarden, 2007 ; Lamalice, Houle et Huot, 2006 ; Shen *et al.*, 2012 ; Uchida *et al.*, 2008 ; Zeng, Sanyal et Mukhopadhyay, 2001). As such, Tyr1059 of VEGFR-2 is required for VEGF-induced MAPK activation and EC proliferation, whereas Tyr951 is essential for EC migration (Zeng, Sanyal et Mukhopadhyay, 2001). The phosphorylation of Tyr1175 residue conveys the VEGF signal to ERK pathway, which is critically required for the subsequent stimulation of EC proliferation (Holmes *et al.*, 2007). However, the autophosphorylated tyrosines within VEGFR-2 responsible to SAPK/JNK pathway activation, which is critical for VEGF-induced angiogenesis (Shen *et al.*, 2012 ; Uchida *et al.*, 2008), still remain unknown. It was reported that the phosphorylation of Tyr1214 is responsible to the activation of SAPK2/p38 by VEGF but not of ERK (Lamalice, Houle et Huot, 2006). Our data suggest a possible involvement of Tyr1214 in SAPK/JNK activation. Indeed, the HUVECs treatment using HT showed an IC_{50} of 8.4 μ M for pTyr1214, similar to that obtained for pSAPK/JNK with an IC_{50} of 9.9 μ M. Furthermore, since HT inhibited both Tyr1059 phosphorylation and SAPK/JNK activity with a similar IC_{50} , it seems that the phosphorylation of Tyr1059 residue would also mediate SAPK/JNK activation in HUVECs. We extend these observations by showing that the inhibition of Tyr1059 phosphorylation, but not of Tyr1214, by Tax and OA is correlated to the inhibition of pSAPK/JNK in HMVECs. Although the exact mechanisms underlying the inhibitory effect of olive oil compounds on this pathway remain to be determined, it is tempting to speculate that Tyr1059 of VEGFR-2 could mediate SAPK/JNK pathway activation. Overall, it is, therefore, possible that blocking ERK and SAPK/JNK pathways and/or VEGFR-2 phosphorylation with Tax, OA and HT may lead to the inhibition of VEGF-induced proliferation and migration of HUVECs in a concentration- and time-dependent manner, and consequently, reduced EC ability to differentiate into capillary-like structures. These inhibitory effects seem to be specific to Tax, OA and HT, because the other olive oil

compounds tested (TyrOH and OL) were less potent.

The majority of the studies on bioavailability of olive oil phenolic compounds have focused on HT, TyrOH, and OL. These studies have shown that these compounds are concentration-dependently absorbed and highly bioavailable, further supporting the putative health promoting effects of these compounds (Visioli *et al.*, 2000 ; Vissers *et al.*, 2002). In humans, it was estimated that at least 55-66% of ingested olive oil phenolic compounds is absorbed (Vissers *et al.*, 2002), metabolized and distributed throughout the body, even across the blood-brain barrier (Serra *et al.*, 2012). However, the amount of these compounds detected in human plasma is highly variable and depends on the type of olive cultivars, the extraction and analytical procedure of olive oil, the chemical structure of the phenolic compounds and the nutrition customs (Fito *et al.*, 2007 ; Vissers *et al.*, 2002). Nevertheless, the total plasma concentration after consumption in humans has been reported to be in the range of 0.1-25 μM (Covas *et al.*, 2006 ; Rafehi, Ververis et Karagiannis, 2012 ; Vissers, Zock et Katan, 2004 ; Zrelli *et al.*, 2011). In our study, we observed that low μM concentrations of olive oil compounds were sufficient to significantly inhibit VEGFR-2 activity. Indeed, a half maximal inhibition of VEGF-dependent tyrosine residues phosphorylation in VEGFR-2 by the best potent inhibitor HT could be observed at concentrations around 7 to 30 μM . It is thus tempting to speculate that these concentrations are behaviourally achievable in humans and that the inclusion of olive oil in the diet may exert some chemopreventive effects through the inhibition of tumor-associated angiogenesis.

Taken together, this study provides molecular evidence that Tax, OA and HT potently suppress angiogenesis by targeting VEGFR-2 activation in a concentration-dependent manner. These results provide new mechanisms of action for these olive oil compounds, and contribute to explain, in part, the beneficial effect of the Mediterranean diet in the prevention of cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' contributions

Conception and design: S. Lamy

Development of methodology: S.Lamy, A. Ouanouki

Acquisition of data: A. Ouanouki

Analysis and interpretation of data: S. Lamy, A. Ouanouki

Writing, review, and/or revision of the manuscript: S. Lamy, A. Ouanouki, R. Béliveau, R.R. Desrosiers

Administrative, technical, or material support: R. Béliveau

Study supervision: S. Lamy, R. Béliveau, R.R. Desrosiers

Acknowledgments

We thank Julie Poirier for her technical support.

Grant Support

This study was fund by the Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment from Université du Québec à Montréal (UQÀM).

2.6 References

- Bendini, A., L. Cerretani, A. Carrasco-Pancorbo, AM. Gomez-Caravaca, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutierrez et G. Lercker. 2007. «Phenolic molecules in virgin olive oil: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade». *Molecules*, vol. 12, no 1679-719.
- Bhat, TA., et RP. Singh. 2008. «Tumor angiogenesis--a potential target in cancer chemoprevention». *Food Chem Toxicol*, vol. 46, p. 1334-1345.
- Charoenprasert, S., et A. Mitchell. 2012. «Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*)». *J Agric Food Chem*, vol. 60, no 29, p. 7081-7095.
- Cicerale, S., X. A. Conlan, A. J. Sinclair et R. S. Keast. 2009. «Chemistry and health of olive oil phenolics». *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 49, no 3, p. 218-236.
- Covas, M. I., K. de la Torre, M. Farre-Albaladejo, J. Kaikkonen, M. Fito, C. Lopez-Sabater, M. A. Pujadas-Bastardes, J. Joglar, T. Weinbrenner, R. M. Lamuela-Raventos et R. de la Torre. 2006. «Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans». *Free Radic Biol Med*, vol. 40, no 4, p. 608-616.
- Cross, M. J., J. Dixelius, T. Matsumoto et L. Claesson-Welsh. 2003. «VEGF-receptor signal transduction». *Trends Biochem Sci*, vol. 28, no 9, p. 488-494.
- Dougher, M., et B. I. Terman. 1999. «Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization». *Oncogene*, vol. 18, no 8, p. 1619-1627.
- Escrich, E., R. Moral, L. Grau, I. Costa et M. Solanas. 2007. «Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer». *Mol Nutr Food Res*, vol. 51, no 10, p. 1279-1292.
- Fabiani, R., A. De Bartolomeo, P. Rosignoli, M. Servili, G. F. Montedoro et G. Morozzi. 2002. «Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis». *Eur J Cancer Prev*, vol. 11, no 4, p. 351-358.
- Ferrara, N. 2009. «VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth». *Eur Cytokine Netw*, vol. 20, no 4, p. 158-163.
- Filik, L., et O. Ozyilkan. 2003. «Olive-oil consumption and cancer risk». *Eur J Clin Nutr*, vol. 57, no 1, p. 191.

- Fito, M., R. de la Torre, M. Farre-Albaladejo, O. Khymenetz, J. Marrugat et M. I. Covas. 2007. «Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review». *Ann Ist Super Sanita*, vol. 43, no 4, p. 375-381.
- Folkman, J. 2006. «Angiogenesis». *Annu Rev Med*, vol. 57, p. 1-18.
- Folkman, J., et Y. Shing. 1992. «Angiogenesis». *J Biol Chem*, vol. 267, no 16, p. 10931-10934.
- Han, J., T. P. Talorete, P. Yamada et H. Isoda. 2009. «Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells». *Cytotechnology*, vol. 59, no 1, p. 45-53.
- Holmes, K., OL. Roberts, AM. Thomas et MJ. Cross. 2007. «Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition». *Cell Signal*, vol. 19, p. 2003-2012.
- Kamba, T., et D. M. McDonald. 2007. «Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer». *Br J Cancer*, vol. 96, no 12, p. 1788-1795.
- Katz, M., I. Amit et Y. Yarden. 2007. «Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, no 8, p. 1161-1176.
- Kendall, R. L., R. Z. Rutledge, X. Mao, A. J. Tebben, R. W. Hungate et K. A. Thomas. 1999. «Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues». *J Biol Chem*, vol. 274, no 10, p. 6453-6460.
- Koch, S., S. Tugues, X. Li, L. Gualandi et L. Claesson-Welsh. 2011. «Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors». *Biochem J*, vol. 437, no 2, p. 169-183.
- Kontou, N., T. Psaltopoulou, D. Panagiotakos, M. A. Dimopoulos et A. Linos. 2011. «The mediterranean diet in cancer prevention: a review». *J Med Food*, vol. 14, no 10, p. 1065-1078.
- Lamallice, L., F. Houle et J. Huot. 2006. «Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF». *J Biol Chem*, vol. 281, no 45, p. 34009-34020.
- Lamy, S., V. Bedard, D. Labbe, H. Sartelet, C. Barthomeuf, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «The dietary flavones apigenin and luteolin impair smooth muscle cell migration and VEGF expression through inhibition of PDGFR-beta phosphorylation». *Cancer Prev Res (Phila)*, vol. 1, no 6, p. 452-459.

- Lamy, S., M. Blanchette, J. Michaud-Levesque, R. Lafleur, Y. Durocher, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras et R. Beliveau. 2006. «Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation». *Carcinogenesis*, vol. 27, no 5, p. 989-996.
- Lamy, S., D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation». *Cancer Res*, vol. 62, no 2, p. 381-385.
- Liekens, S., E. De Clercq et J. Neyts. 2001. «Angiogenesis: regulators and clinical applications». *Biochem Pharmacol*, vol. 61, no 3, p. 253-270.
- Matsumoto, T., S. Bohman, J. Dixelius, T. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J. H. Qi, C. Wernstedt, J. Wu, S. Bruheim, H. Mugishima, D. Mukhopadhyay, A. Spurkland et L. Claesson-Welsh. 2005. «VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis». *EMBO J*, vol. 24, no 13, p. 2342-2353.
- Niu, G., et X. Chen. 2010. «Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy». *Curr Drug Targets*, vol. 11, no 8, p. 1000-1017.
- Owen, R. W., A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, G. Wurtele, B. Spiegelhalder et H. Bartsch. 2000. «Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants». *Lancet Oncol*, vol. 1, p. 107-112.
- Pauwels, EK. 2011. «The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk». *Med Princ Pract*, vol. 20, p. 103-111.
- Pelucchi, C., C. Bosetti, E. Negri, L. Lipworth et C. La Vecchia. 2011. «Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010». *Curr Pharm Des*, vol. 17, no 8, p. 805-812.
- Rafehi, H., K. Ververis et T. C. Karagiannis. 2012. «Mechanisms of action of phenolic compounds in olive». *J Diet Suppl*, vol. 9, no 2, p. 96-109.
- Scoditti, E., N. Calabriso, M. Massaro, M. Pellegrino, C. Storelli, G. Martines, R. De Caterina et MA. Carluccio. 2012. «Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potential protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer». *Arch Biochem Biophys*, vol. 527, p. 81-89.
- Serra, A., L. Rubio, X. Borrás, A. Macià, M. P. Romero et M. J. Motilva. 2012. «Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake». *Mol Nutr Food Res*, vol. 56, no 3, p. 486-496.

- Shen, K., L. Ji, B. Lu et Z. Wang. 2012. «c-Jun N-terminal kinase mediated VEGFR2 sustained phosphorylation is critical for VEGFA-induced angiogenesis in vitro and in vivo». *Cell Biochem Biophys*, vol. 64, no 1, p. 17-27.
- Sofi, F., R. Abbate, G. F. Gensini et A. Casini. 2010. «Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis». *Am J Clin Nutr*, vol. 92, no 5, p. 1189-1196.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida et M. Shibuya. 2001. «A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells». *EMBO J*, vol. 20, no 11, p. 2768-2778.
- Terzuoli, E., S. Donnini, A. Giachetti, MA. Iniguez, M. Fresno, G. Melillo et M. Ziche. 2010. «Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis ». *Clin Cancer Res*, vol. 16, p. 4207-4216.
- Trichopoulou, A., P. Lagiou, H. Kuper et D. Trichopoulos. 2000. «Cancer and Mediterranean dietary traditions». *CANCER EPIDEM BIOMAR*, vol. 9, p. 869-873.
- Uchida, C., E. Gee, E. Ispanovic et T. L. Haas. 2008. «JNK as a positive regulator of angiogenic potential in endothelial cells». *Cell Biol Int*, vol. 32, no 7, p. 769-776.
- Underiner, T. L., B. Ruggeri et D. E. Gingrich. 2004. «Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy». *Curr Med Chem*, vol. 11, no 6, p. 731-745.
- Verberne, L., A. Bach-Faig, G. Buckland et L. Serra-Majem. 2010. «Association between the Mediterranean diet and cancer risk: a review of observational studies». *Nutr Cancer*, vol. 62, no 7, p. 860-870.
- Visioli, F., C. Galli, F. Bornet, A. Mattei, R. Patelli, G. Galli et D. Caruso. 2000. «Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans». *FEBS Lett*, vol. 468, no 2-3, p. 159-160.
- Visser, M. N., P. L. Zock et M. B. Katan. 2004. «Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review». *Eur J Clin Nutr*, vol. 58, no 6, p. 955-965.
- Visser, M. N., P. L. Zock, A. J. Roodenburg, R. Leenen et M. B. Katan. 2002. «Olive oil phenols are absorbed in humans». *J Nutr*, vol. 132, no 3, p. 409-417.
- Wiseman, M. 2008. «The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective». *Proc Nutr Soc*, vol. 67, no 3, p. 253-256.

- Yuan, L., I. S. Ahn et P. F. Davis. 2007. «Inhibition of tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptors in human umbilical vein endothelial cells: a potent anti-angiogenic lipid-rich extract from shark». *J Med Food*, vol. 10, no 4, p. 657-661.
- Yuan, L., M. Yoshida et P. F. Davis. 2006. «Inhibition of pro-angiogenic factors by a lipid-rich shark extract». *J Med Food*, vol. 9, no 3, p. 300-306.
- Zeng, H., S. Sanyal et D. Mukhopadhyay. 2001. «Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively». *J Biol Chem*, vol. 276, no 35, p. 32714-32719.
- Zrelli, H., M. Matsuka, M. Araki, M. Zarrouk et H. Miyazaki. 2011. «Hydroxytyrosol induces vascular smooth muscle cells apoptosis through NO production and PP2A activation with subsequent inactivation of Akt». *Planta Med*, vol. 77, no 15, p. 1680-1686.

2.7 Legends for figures

Fig. 2.1 - Olive oil compounds inhibit VEGF-induced tube formation of HUVECs. (A) Chemical structures of olive oil compounds. (B) HUVECs were pretreated for 24 h with 50 μ M olive oil compounds before adhesion onto growth factor reduced Matrigel matrix. Cells were then collected and seeded onto Matrigel-coated 96-well plates at 20 000 cells/well and stimulated with 1 μ g/mL VEGF as described in the Methods section. After 6 h, capillary-like structures were photographed ($\times 60$) and quantitated using ImageJ software. The pictures shown are representative of five independent experiments. Values are means \pm SEM of one representative experiment performed in triplicate (* p < 0.05 and *** p < 0.001 versus untreated cells or those treated with VEGF alone).

Fig. 2.2 - Olive oil compounds inhibit VEGF-induced proliferation of HUVECs. (A) VEGF (25 ng/mL) was added 24 h after HUVECs seeding with 50 μ M of indicated olive oil compounds and cell proliferation was measured using the xCELLigence system as described in the Methods section. Values are means \pm SEM of three independent experiments performed in quadruplicate (** p < 0.01 and *** p < 0.001 versus VEGF alone). (B) After treatment with 50 μ M olive oil compounds, adherent and non-adherent cells were collected, and viability was quantified using the NucleoCounter system. Cell death is expressed as the percentage of cells incorporating the fluorescent dye propidium iodide. (C) Impedance responses obtained from the xCELLigence system following treatment with various concentrations of Tax, (D) HT and (E) OA.

Fig. 2.3 - Olive oil compounds inhibit VEGF-induced migration of HUVECs. (A) HUVECs were starved in 1% FBS for 24 h before adhesion into a CIM-Plates coated with 0.15% gelatin. Then, cells were treated with VEGF (50 ng/mL) alone or in the presence of indicated olive oil compounds (50 μ M) for 18 h. Values are means \pm SEM of three independent experiments performed in quadruplicate (* p < 0.05 and *** p < 0.001 versus VEGF alone). (B) Impedance responses obtained from the xCELLigence system following treatment with various concentrations of Tax, (C) OA and (D) HT.

Fig. 2.4 - Olive oil compounds inhibit VEGF-induced tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in HUVECs. (A) Quiescent HUVECs were incubated in 1% FBS containing (or lacking) 50 μ M of indicated olive oil compounds for 24 h or with various concentrations (5, 10, 15, 25, 35 or 50 μ M) of (B) Tax, (C) OA or (D) HT. Then, cells were stimulated with 50 ng/mL of VEGF for 2 min. HUVECs were lysed and the levels of various tyrosine-phosphorylated residues in VEGFR-2, along with their total protein level were monitored by immunoblotting using specific antibodies. The bands intensities were analyzed by densitometry using ImageJ software and expressed in arbitrary units as a ratio of levels of phosphorylated protein to those of the total protein to correct for variation in the amount of protein. The relative levels of phosphorylated protein were also normalized to those seen in VEGF control (value = 1). Western Blots are representative pictures. Data are means representative of three independent experiments.

Fig. 2.5 - Taxifolin, oleic acid and hydroxytyrosol inhibit VEGF downstream signaling events in ECs. Quiescent HUVECs (A-C) or HMVECs (D) were incubated in 1% FBS containing (or lacking) various concentrations (5, 10, 15, 25, 35 or 50 μ M) of indicated olive oil compounds for 24 h before adding VEGF (50 ng/mL). After cell treatments, the extent of the phosphorylated forms of ERK, SAPK/JNK, along with their total protein level, were monitored by immunoblotting using specific antibodies. The bands intensities were analyzed by densitometry using ImageJ software and expressed in arbitrary units as a ratio of levels of phosphorylated protein to those of the total protein to correct for variation in the amount of protein. The relative levels of phosphorylated protein were also normalized to those measured in VEGF control (value = 1). Western Blots are representative pictures. Data are means of three independent experiments.

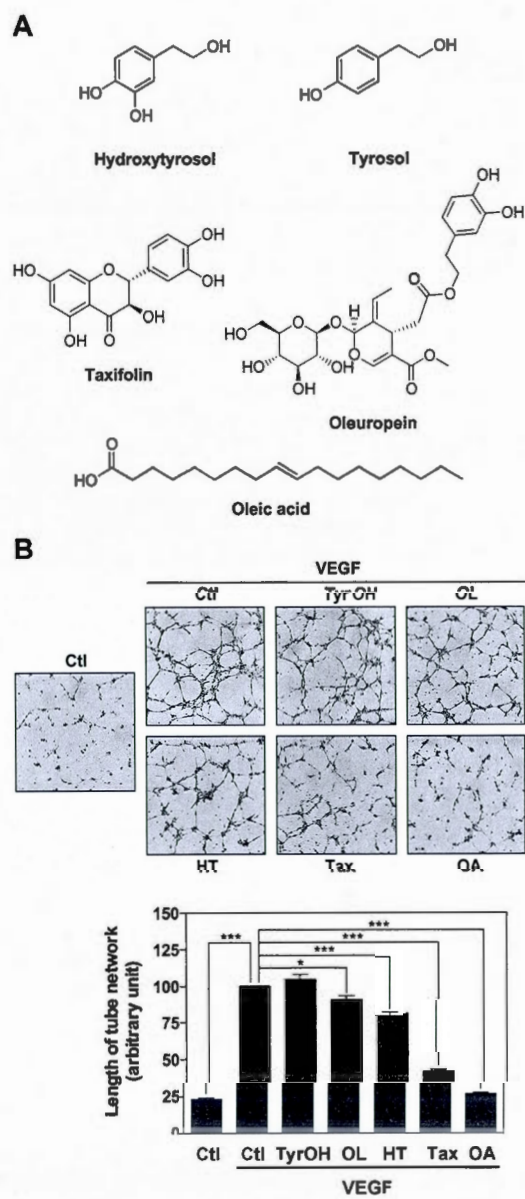


Figure 2.1

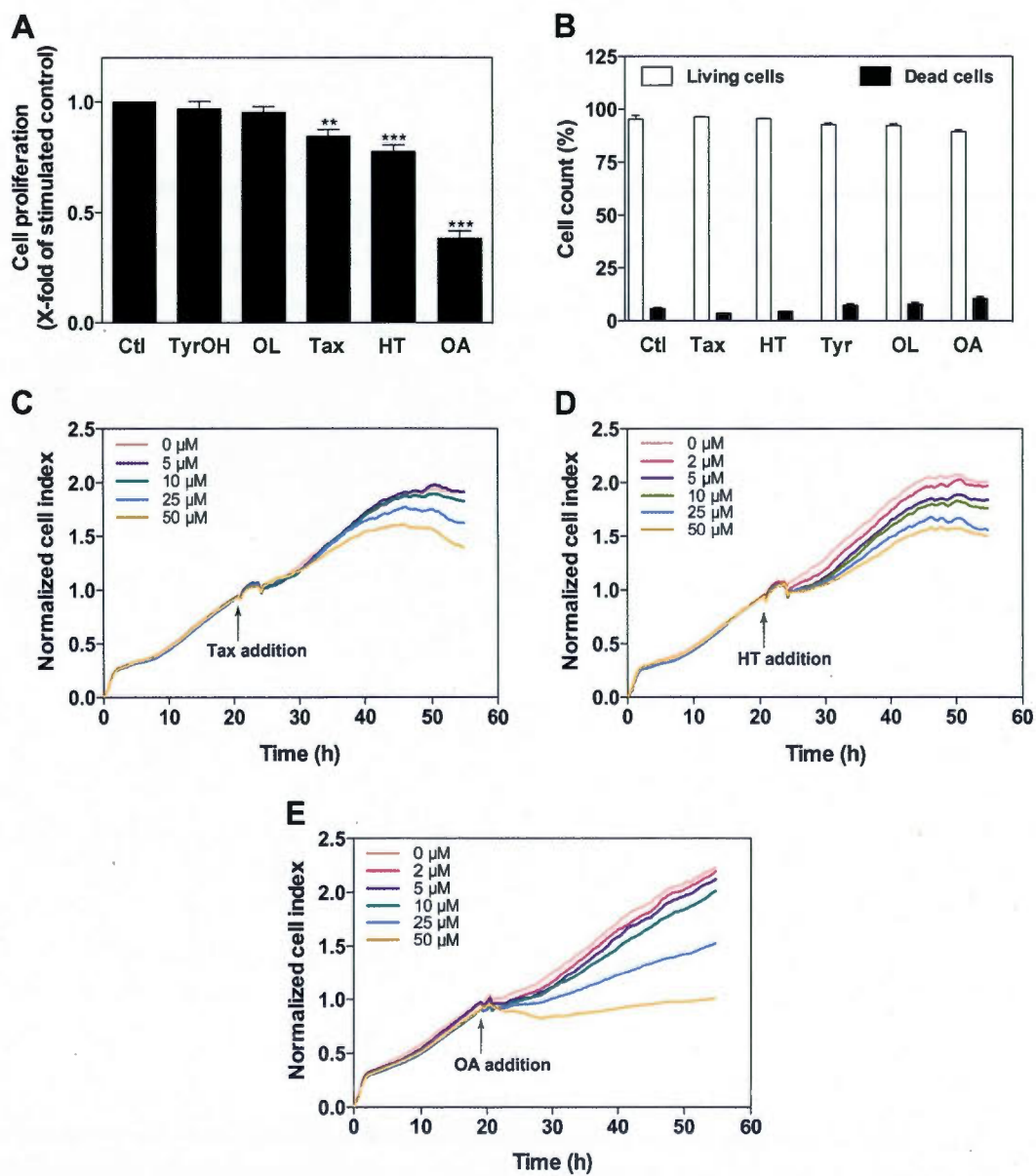


Figure 2.2

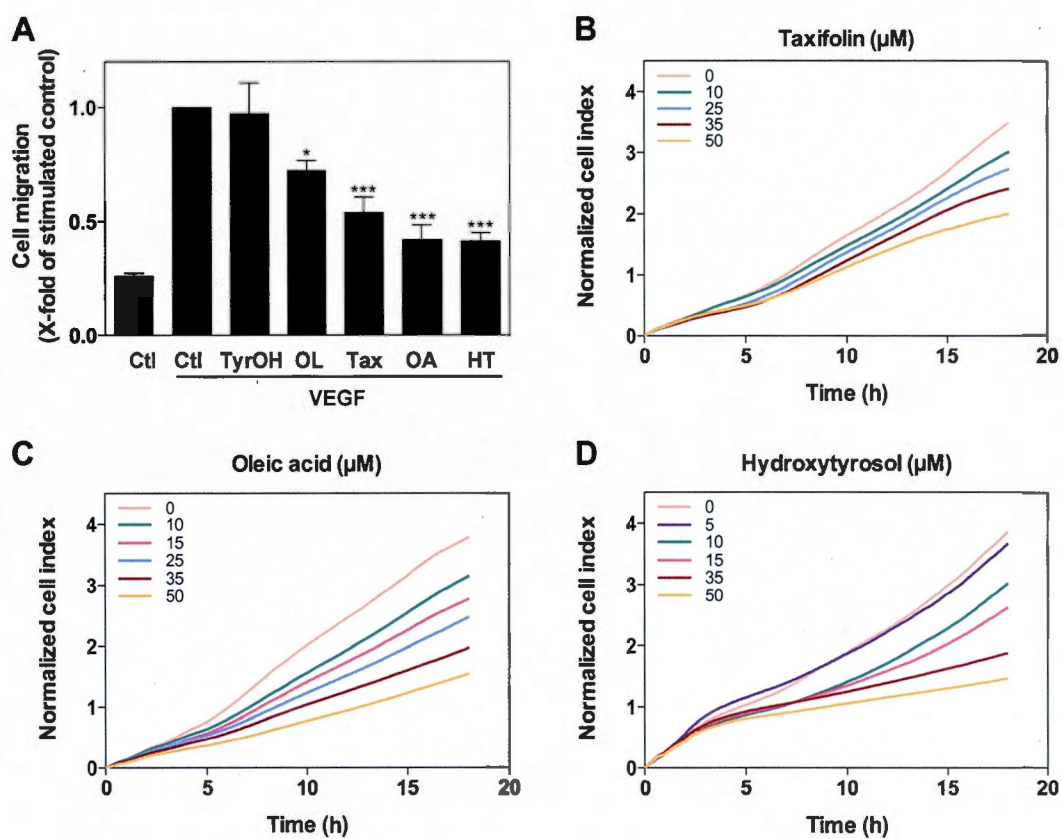


Figure 2.3

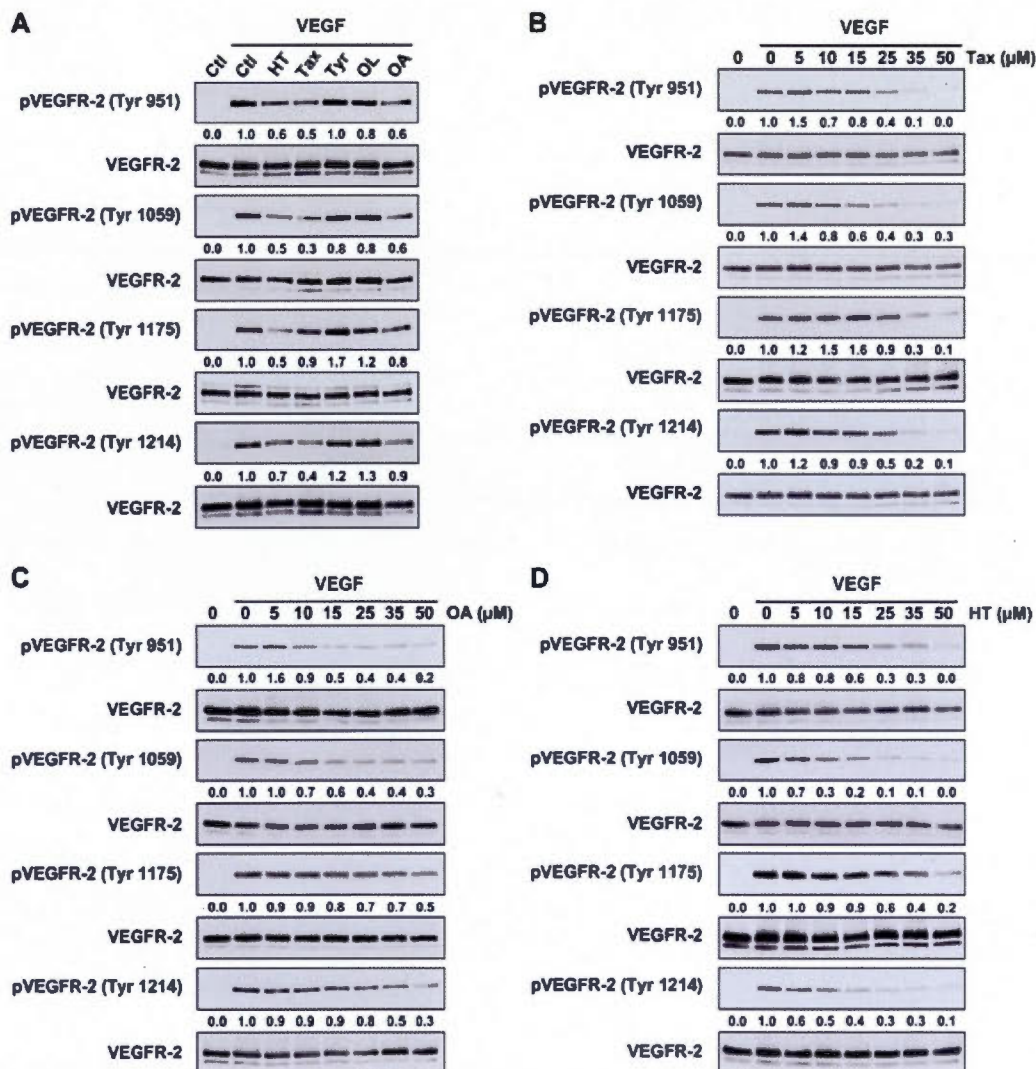


Figure 2.4

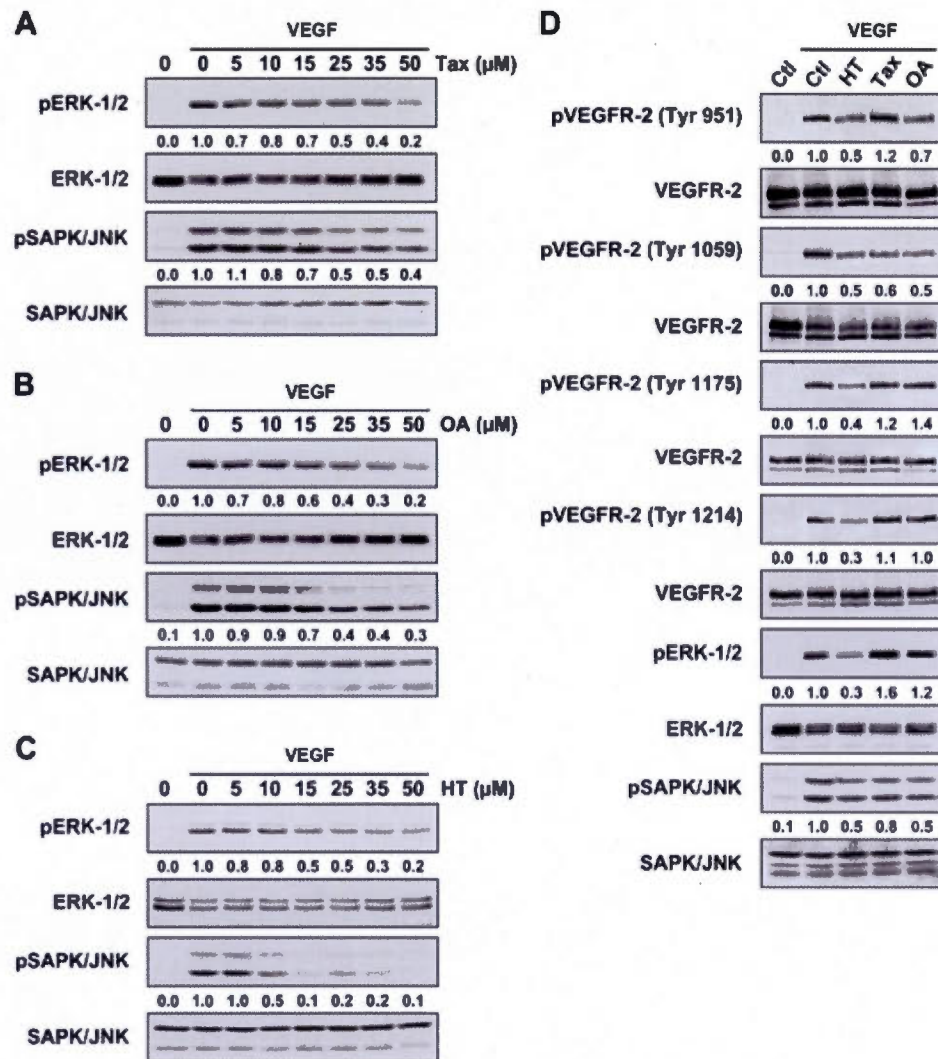


Figure 2.5

Table 2.1 - IC₅₀ values of olive oil compounds on VEGFR-2/MAPK phosphorylation.

| Olive oil compounds | IC ₅₀ (μM) | | | | pERK-1/2 | pSAPK/JNK |
|---------------------|---------------------------|---------|---------|---------|----------|-----------|
| | VEGFR-2 tyrosine residues | | | | | |
| | Tyr951 | Tyr1059 | Tyr1175 | Tyr1214 | | |
| Tax | 23.3 | 26.4 | 33.0 | 25.6 | 27.2 | 27.5 |
| OA | 10.8 | 13.8 | 50.0 | 35.0 | 23.4 | 21.1 |
| HT | 19.6 | 7.4 | 30.2 | 8.4 | 21.9 | 9.9 |

NOTE: IC₅₀ is defined as the concentration (μM) at which olive oil compounds inhibit 50% of VEGF-induced phosphorylation of tyrosine residues within VEGFR-2 or downstream substrates. The IC₅₀ values were calculated using dose-response curves for each condition. Data are representative of three independent experiments.

CHAPITRE III

DISCUSSION

Depuis la découverte du rôle de l'angiogenèse dans le développement des tumeurs (Folkman, 1971), plusieurs stratégies antiangiogéniques ont été développées afin de limiter voire d'inhiber la croissance des tumeurs en ciblant les composants de l'angiogenèse tumorale. Parmi les facteurs angiogéniques régulant les cellules endothéliales, on retrouve le PD-ECGF (facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes), l'IGF-1 (facteur de croissance analogue à l'insuline) et le VEGF; ce dernier représente le facteur de survie le plus important pour les cellules endothéliales. Pour contrer l'angiogenèse tumorale, des inhibiteurs spécifiques de l'axe VEGF-VEGFR ont été développés tels que l'anticorps neutralisant le VEGF-A et les inhibiteurs des tyrosines kinases. Certains de ces inhibiteurs sont approuvés pour des traitements cliniques tels que le bevacizumab (anticorps monoclonal anti-VEGF-A) utilisé dans le traitement de différents types de cancers (poumons, sein, colorectal, rénal) ainsi que le sorafenib et le sunitinib (inhibiteurs de kinases) utilisés pour le traitement du cancer hépatique et rénal (Shibuya, 2011). D'autres médicaments ciblant l'axe VEGF-VEGFR tels que le VEGF-Trap (protéine de fusion des domaines de liaison des ligands du VEGFR-1 et VEGFR-2), l'anticorps anti-VEGFR-1 ou anti-VEGFR-2, le VEGFR-3 soluble et l'anticorps anti-PlGF ont été développés et sont en cours d'essais précliniques et cliniques (Young et Reed, 2012). Compte tenu de l'instabilité génétique des cellules cancéreuses, une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie se développe rapidement (Young et Reed, 2012). En outre, suite à la prise de ces médicaments antiangiogéniques, plusieurs effets secondaires ont été rapportés tels l'hypertension, le dysfonctionnement rénal, l'hypothyroïdie, la thrombose, des perforations intestinales, le syndrome d'encéphalopathie et des hémorragies sévères fatales (Kieran, Kalluri et Cho, 2012). Aussi, la découverte des molécules phytochimiques antiangiogéniques constitue un avantage pour le contrôle du développement tumoral et métastatique, comparativement aux

thérapies non sélectives et cytotoxiques. Outre leurs effets antiangiogéniques et antitumoraux, les molécules issues de la diète n'affectent pas la survie des cellules normales (Li *et al.*, 2012). Toute nouvelle information sur les molécules jouant un rôle antiangiogénique ainsi que leurs mécanismes d'action peuvent s'avérer utiles pour la recherche médicale et chimiopréventive.

Plusieurs composés naturels sont connus pour leurs effets inhibiteurs de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* tels que l'apigénine, l'epicatechine-3-gallate, l'isoliquiritin, l'acide linoléique et le magnosalin. D'autres composés tels que le silibinine, le resvératrol, le philinopside-A, le phenethyl isothiocyanate, la genistéine, l'épigallocatechine gallate et la curcumine ont été révélés comme des inhibiteurs de la signalisation dépendante du VEGF dans les cellules endothéliales. Ces molécules phytochimiques inhibent la phosphorylation des différents résidus tyrosines du VEGFR affectant une ou plusieurs étapes clés de l'angiogenèse (Bhat et Singh, 2008). De ce fait, le ciblage de la signalisation des récepteurs des cellules endothéliales est considéré comme une stratégie efficace pour la prévention des développements tumoraux.

Plusieurs études se sont intéressées à l'identification de molécules antitumorales et anticancéreuses présentes dans l'huile d'olive étant donné son impact sensible dans la chimioprévention. Yuan *et al* (2006) ont démontré qu'un extrait éthanolique de muscle de requin lyophilisé et mélangé à l'huile d'olive inhibait l'activation du VEGFR en jouant le rôle d'antagoniste du VEGF (Yuan, Yoshida et Davis, 2006). L'acide de maslinic, un triterpène trouvé dans les olives, inhibe la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules cancéreuses pancréatiques (DU145) en supprimant l'expression du VEGF, des E-cadhérines et des MMPs (Park *et al.*, 2013). Aussi, l'acide oléique, présent à 72% dans l'huile d'olive, régule à la baisse l'expression d'un oncogène, Her-2/neu, surexprimé dans le cancer du sein (Waterman et Lockwood, 2007). Cependant, il n'y a pas d'études qui démontrent les mécanismes des molécules de l'huile d'olive sur l'angiogenèse tumorale. Ceci nous a incité à étudier les propriétés antiangiogéniques et les mécanismes d'action des principales molécules de l'huile d'olive.

Les cellules endothéliales dérivées de la veine du cordon ombilical humain (HUVECs) ont servi de modèle cellulaire pour cette étude. Ce modèle de cellules endothéliales est une percée majeure dans la médecine moléculaire et la compréhension des mécanismes de contrôle de l'angiogenèse en réponse à l'hypoxie et à l'inflammation dans les tumeurs. Ces cultures primaires, lorsqu'utilisées au cours des premiers passages, maintiennent la majorité des fonctionnalités natives des cellules endothéliales vasculaires : expression des marqueurs spécifiques tels que le facteur von Willebrand et la molécule d'adhésion spécifique à l'endothélium (CD31), expression de récepteurs de facteurs de croissance, de cytokines, de ligands spécifiques vasoactifs et de voies de signalisation du VEGF (Park *et al.*, 2006).

Nos principaux résultats démontrent que HT, Tax et AO bloquent l'angiogenèse *in vitro* induite par le VEGF en inhibant la prolifération, la migration et la tubulogenèse des HUVECs. Nos résultats supportent un mécanisme potentiel derrière ces effets inhibiteurs qui peut être attribuable à l'inhibition de la phosphorylation des résidus tyrosines du VEGFR-2 menant à l'inhibition des cascades de signalisation cellulaire telles que celles de la phosphorylation du p42/p44 MAPK (ERK-1/2) et p46/p54 SAPK/JNK.

Dans un premier temps, nous avons testé les cinq molécules de l'huile d'olive sur le processus de la tubulogenèse. Les résultats obtenus démontrent une inhibition significative de la tubulogenèse, induite par le VEGF, pour quatre d'entre elles soient OL, HT, Tax et AO avec une inhibition de plus de 50% pour Tax et AO. La TyrOH n'a pas eu d'effet sur la tubulogenèse. Aussi, les cinq molécules ont été testées sur la prolifération et la migration des HUVECs, deux étapes importantes de l'angiogenèse tumorale. Nous avons noté que les quatre molécules (OL, HT, Tax et AO) ayant inhibé la tubulogenèse inhibent aussi la migration des HUVECS entre 30 et 60% comparativement au contrôle VEGF. La prolifération des HUVECs a été affectée par Tax, HT et AO. Par des essais en temps réel, nous avons pu noter qu'au niveau des processus cellulaires, Tax, AO et HT affectent la prolifération et la migration des HUVECs en fonction du temps et de la concentration des molécules testées. On s'est assuré que les traitements avec les molécules de l'huile d'olive

n'affectent pas la survie cellulaire et qu'ainsi la qualité des résultats obtenus correspondent aux effets réels antiangiogéniques des molécules et non à de la cytotoxicité.

Dans un deuxième temps, nous avons démontré que Tax, AO et HT inhibent la phosphorylation de certains résidus tyrosine du VEGFR-2 impliqués dans l'angiogenèse : Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 et Tyr1214. La phosphorylation des résidus tyrosines : Tyr951, Tyr1175 et Tyr1214 est responsable de la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF (Cicerale, Lucas et Keast, 2010). Il a été démontré qu'une incapacité de phosphorylation de l'une de ces tyrosines et/ou la voie de EKR-1/2 ou celle de SAPK/JNK cause une altération de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales. Aussi, une mutation du résidu Tyr951 cause une inhibition de la réorganisation d'actine affectant ainsi la migration des cellules endothéliales mais pas la prolifération (Berger et Ballmer-Hofer, 2011). Effectivement, nos essais démontrent que TyrOH est le seul composé de l'huile d'olive n'ayant pas affecté la migration des cellules endothéliales, ceci revient au fait que le résidu Tyr951 a été phosphorylé par le VEGF et que le traitement des HUVECs avec TyrOH n'a pas affecté cette phosphorylation. Nos résultats démontrent que le résidu Tyr951 est nécessaire à la migration des HUVECs corroborant l'étude faite par Zeng *et al* en 2001 (Zeng, Sanyal et Mukhopadhyay, 2001). La phosphorylation du résidu Tyr1059 permet la stabilisation de l'activité du VEGFR-2 et est nécessaire à l'activation de la voie de MAPK par le VEGF ainsi qu'à la prolifération des cellules endothéliales. Le résidu Tyr1175 est crucial pour le développement endothélial, car elle permet la stimulation de la voie de ERK indispensable à la prolifération des cellules endothéliales. Ceci est en accord avec nos observations qui démontrent qu'un traitement avec TyrOH tend à augmenter la phosphorylation du résidu Tyr1175 de VEGFR-2 et que la migration des HUVECs n'est pas inhibée par ce composant de l'huile d'olive. Il a été démontré que les souris ayant des mutations au niveau du résidu Tyr1175 meurent suite à une déficience de progéniteurs de cellules souches hématopoïétiques et de cellules endothéliales tandis qu'une mutation au niveau du résidu Tyr1214 n'affecte pas la viabilité des souris. La phosphorylation de ce dernier serait responsable de l'activation de la voie p38MAPK (Koch et Claesson-Welsh, 2012). Cependant, la phosphorylation de la tyrosine du VEGFR-2 responsable de l'activation de la voie SAPK/JNK, nécessaire à l'angiogenèse induite par le VEGF, demeure inconnue.

Nos données montrent une possible implication des résidus Tyr1059 et Tyr1214 dans l'activation de SAPK/JNK. Lorsque les HUVECs sont traitées avec HT, des concentrations de cet inhibiteur causant 50% d'inhibition (IC_{50}) de la phosphorylation des résidus Tyr1214 et Tyr1059 sont de 8,4 μ M et de 7,4 μ M, respectivement. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues pour pSAPK/JNK avec une IC_{50} de 9,9 μ M. Pour appuyer cette hypothèse, HT, Tax et AO ont été testées dans une autre lignée de cellules endothéliales microvasculaires humaines, les HMVECs. Nous avons noté de nouveau une corrélation entre l'inhibition par Tax et AO, de la phosphorylation du résidu Tyr1059 et de celle de SAPK/JNK, mais pas celle du résidu Tyr1214. À la lueur de ces résultats, nous pouvons supposer que le résidu Tyr1059 est impliqué dans l'activation de SAPK/JNK dans les CE. Par la suite, nous avons démontré que l'inhibition de la phosphorylation des résidus Tyr951, Tyr1059, Tyr1175 et Tyr1214 ainsi que celle de l'activation de ERK-1/2 et de SAPK/JNK par Tax, AO et HT dépendent de la concentration de ces dernières. Dans des expériences préliminaires, nous avons analysé globalement l'état de la phosphorylation du VEGFR-2 par la méthode d'immunoprécipitation du récepteur. Les résultats montrent que les cinq molécules (HT, Tax, TyrOH, OL et AO) diminuent la phosphorylation du VEGFR-2 avec des taux d'inhibition de 36, 38, 34, 20, et 34 %, respectivement (Figure 3.1). Le fait que TyrOH peut moduler à la baisse l'activation du VEGFR-2 peut signifier que cette molécule affecte d'autres résidus tyrosines phosphorylables, autres que ceux testés dans la présente étude. Toutefois, la phosphorylation de ces résidus ne serait pas nécessaire aux processus de prolifération et de migration cellulaires ni à la tubulogenèse. D'autre part, l'analyse par PCR en temps réel montre que l'expression génique du VEGFR-2 n'est pas affectée par HT, Tax et AO (Figure 3.2) confirmant les résultats précédents observés au niveau protéique.

Les composés phénoliques de l'huile d'olive sont hautement biodisponibles et leur absorption, chez l'humain, est estimée entre 55 et 60% (Omar, 2010). La polarité joue un rôle dans le mécanisme d'absorption; il a été rapporté que HT et TyrOH, molécules polaires, sont absorbés par diffusion passive. Aussi, OL, molécule polaire plus large, peut diffuser à travers la bicouche lipidique de la membrane de la cellule endothéliale et est aussi absorbée par un transporteur de glucose, cependant les mécanismes d'absorption de OL ne sont pas connus (Cicerale, Lucas et Keast, 2010). L'absorption de HT et TyrOH dépend de leur concentration

dans l'huile d'olive (40 à 95%) (Cicerale, Lucas et Keast, 2010). La concentration plasmatique totale des métabolites phénoliques et de leurs formes libre après consommation d'huile d'olive chez l'homme se situe entre 0,2 et 59 μM (Suarez *et al.*, 2009). Dans notre étude, on a observé que de faibles concentrations de composés d'huile d'olive peuvent inhiber efficacement la phosphorylation des résidus tyrosines du VEGFR-2. L'inhibiteur le plus efficace, HT, bloque la phosphorylation maximale des différents résidus tyrosines du VEGFR-2 de moitié avec des concentrations variant entre 7 et 30 μM . L'AO, un peu moins efficace inhibe entre 10 et 50 μM et finalement Tax agit entre 23 et 33 μM . Ces concentrations peuvent facilement être atteintes chez l'humain ce qui est intéressant si on considère l'utilisation de l'huile d'olive comme moyen de prévention des cancers.

Figures supplémentaires

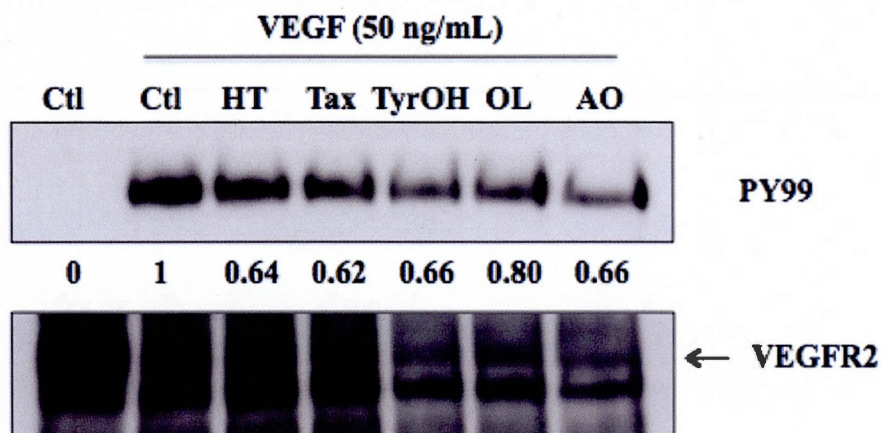


Figure 3.1 : Les composés de l'huile d'olive inhibent la phosphorylation du VEGFR-2 dans les HUVECs. Les HUVECs ont été incubées dans du milieu EBM-2 contenant 1% FBS en présence ou en absence de 50 μ M de composés de l'huile d'olive pendant 24 h. Ensuite, les cellules ont été stimulées avec 50 ng/mL VEGF pour 2 min puis lysées. L'état de phosphorylation du VEGFR-2 a été obtenu par immunoprécipitation du récepteur avec l'anticorps polyclonal anti-VEGFR-2 (Flk-1) sur des billes magnétiques couplées à la protéine A (PureProteomeTM) selon le protocole du manufacturier (Millipore), suivi par l'immunodétection avec l'anticorps monoclonal anti-Tyr(P) (PY99). L'intensité de chacune des protéines immunodétectées a été analysée par densitométrie en utilisant le logiciel ImageJ (NIH). Ces intensités sont exprimées par des valeurs arbitraires représentant les ratios des niveaux de phosphorylation par rapport à ceux des protéines totales. Par la suite, les niveaux de protéines phosphorylées ont été normalisés par rapport au témoin stimulé, le VEGF (valeur = 1).

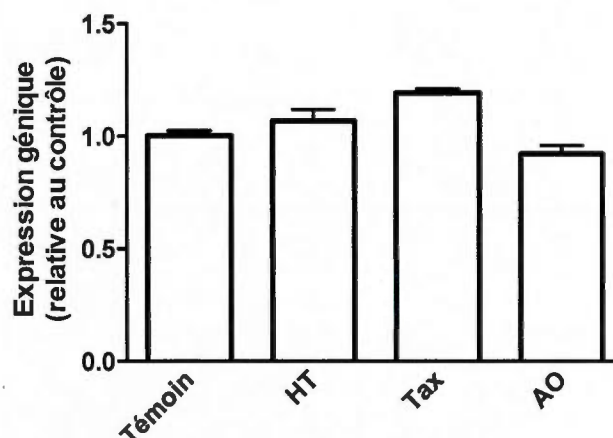


Figure 3.2 : Les molécules de l'huile d'olive n'affectent pas l'expression génique du VEGFR-2. Les HUVECs ont été incubées dans du milieu EBM-2 contenant 1% FBS en présence ou en absence de 50 μ M de composés de l'huile d'olive pendant 24 h. L'ARN total des cellules a été extrait en utilisant le Trizol selon les instructions du manufacturier (Invitrogen) puis l'ADNc a été synthétisé par RT-PCR semi-quantitative suivant le programme : 10 min (25°C) - 120 min (37°C) - 5 min (85°C). Le niveau du transcrit primaire du gène KDR a été déterminé par PCR en temps réel. L'expression génique a été quantifiée par PCR en temps réel en utilisant du iQ SYBER Green Supermix (Bio-Rad). L'amplification de l'ADN a été réalisée grâce au Icyler iQ5 (Bio-Rad) et le produit de détection reflète la liaison du colorant fluorescent SYBR Green I à l'ADN double brin. L'amorce d'ADN du KDR (VEGFR-2 humain) provient de QIAGEN. Le GAPDH et la PPIA ont été utilisés comme gènes de référence. La déviation standard de chacune des conditions de traitement a été calculée à partir d'un triplicata.

CHAPITRE IV

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'identification de molécules d'origine nutritionnelle qui agissent comme inhibiteurs de l'angiogenèse, de même que la caractérisation des mécanismes impliqués dans cet effet antiangiogénique, pourraient représenter un progrès significatif dans le développement de stratégies de prévention du cancer basées sur l'alimentation. La présente étude a démontré que les composés phénoliques ainsi que les acides gras monoinsaturés de l'huile d'olive inhibent l'angiogenèse tumorale dans les HUVECs. L'inhibition de la phosphorylation des principaux résidus tyrosines du VEGFR-2 par Tax, AO et HT conduisent à une inhibition des voies de signalisation de ERK et JNK, affectant ainsi les étapes clefs de l'angiogenèse telles la prolifération, la migration et la formation de structures capillaires des cellules endothéliales. Les actions inhibitrices de ces molécules contribuent ainsi à expliquer, en partie, l'effet bénéfique de la diète méditerranéenne dans la prévention des cancers.

Les chercheurs estiment que l'huile d'olive extra vierge est meilleure comparativement à celle raffinée et ce, grâce à sa teneur élevée en antioxydants (Waterman et Lockwood, 2007). D'après nos résultats, les polyphénols de l'huile d'olive ont un effet antiangiogénique mais aussi AO qui est un acide gras. On peut donc supposer que les effets bénéfiques de l'huile d'olive sont dus non seulement à sa teneur en antioxydants mais aussi à sa concentration en acides gras insaturés; ceci serait à vérifier en testant d'autres acides gras de l'huile d'olive sur l'angiogenèse tumorale. Ainsi, dans un contexte de vie active avec de saines habitudes alimentaires, une diète à base d'huile d'olive peut jouer un effet chimiopréventif en agissant sur l'angiogenèse tumorale. De même, l'effet bénéfique de l'acide oléique présent dans d'autres huiles végétales pourrait expliquer en partie leur effet potentiellement antiangiogénique et anticancéreux.

D'autres recherches seront nécessaires pour appréhender l'identification des molécules angiogéniques issues de l'huile d'olive et leurs mécanismes d'action. En se basant sur les travaux démontrant la capacité de plusieurs molécules d'origine nutritionnelle à interférer avec l'angiogenèse en bloquant simultanément l'activité du VEGFR-2 et du PDGFR- β , on pourrait évaluer le profil d'inhibition de HT, Tax et AO sur l'activité du PDGFR- β . L'impact de ces composés sur la stabilisation des vaisseaux sanguins peut être évalué en utilisant un modèle de co-culture dans lequel l'addition de cellules musculaires lisses (CML) à des cellules endothéliales provoque la formation de vaisseaux stables (Lamy *et al.*, 2008). L'effet des molécules de l'huile d'olive sur ces deux récepteurs aux facteurs de croissance (VEGFR-2 et/ou PDGFR) pourrait être examiné par l'immunoprécipitation de chacun de ces récepteurs et par l'immunobuvardage avec des anticorps anti-phosphotyrosine.

Les composés antiangiogéniques peuvent aussi être étudiés dans un modèle d'angiogenèse *in vivo* en examinant leur potentiel à réduire la vascularisation de gels constitués d'une matrice extracellulaire (matrigel) implantés chez les souris immunodéficientes. Par la suite, les molécules actives peuvent être évaluées pour leur capacité à interférer avec la stabilisation des vaisseaux par les CML en comparant la longueur totale des réseaux formés en absence et en présence de ces molécules. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets inhibiteurs, on pourrait isoler les deux types cellulaires, CE et CML, à l'aide de microbilles magnétiques contenant un anticorps anti-CD34 (marqueur des CE) (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003). Le degré de contamination relatif des deux populations cellulaires sera évalué, par la suite, en mesurant les niveaux d'autres marqueurs spécifiques à chacun des types cellulaires i.e. desmine ou α -actine pour les CML et le facteur VIII pour les cellules endothéliales. De plus, les niveaux d'ARNm codant pour plusieurs protéines connues pour leurs rôles dans l'angiogenèse (Ang-1, Tie-2, bFGF, bFGFR, VEGF, VEGFR-2, PDGF-BB, PDGFR, TGF- β) peuvent être évalués par RT-PCR afin d'identifier des voies de signalisation altérées dans chacun des types cellulaires.

La caractérisation aux niveaux moléculaires et cellulaires dans des modèles d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* démontrent clairement le potentiel des molécules actives de

l'huile d'olive comme exemple de stratégie pour prévenir l'incidence de différents types de cancer en se basant sur la nutrition.

Annexes

Annexe-1

CANCER PREVENTION RESEARCH CAPR-13-0105 – Receipt of New Manuscript

Stephanie.Seymour@aacr.org <Stephanie.Seymour@aacr.org>

Thu, Mar 21, 2013 at 12:19 PM

To: lamy.sylvie@uqam.ca

Cc: mira333@gmail.com, beliveau.richard@uqam.ca, desrosiers.r@uqam.ca

Dear Dr. Lamy,

You have successfully submitted your manuscript to CANCER PREVENTION RESEARCH. Please note that all contributing authors on the paper are copied on this message. Your manuscript information is as follows:

MANUSCRIPT NUMBER
CAPR-13-0105

MANUSCRIPT TITLE
Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation

Please take note of this information for future reference and refer to the manuscript number should you need to contact the journal office during the review process.

You may check on the status of this manuscript by logging on to the system at <http://capr.msubmit.net>, locating the manuscript in your Live Manuscripts queue, and clicking the Check Status link.

Thank you for submitting your work to CANCER PREVENTION RESEARCH.

Sincerely,
CANCER PREVENTION RESEARCH

RÉFÉRENCES

- Aggarwal, B. B., et S. Shishodia. 2006. «Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer». *Biochem Pharmacol*, vol. 71, no 10, p. 1397-1421.
- Beliveau, R., et D. Gingras. 2007. «Role of nutrition in preventing cancer». *Can Fam Physician*, vol. 53, no 11, p. 1905-1911.
- Bendini, A., L. Cerretani, A. Carrasco-Pancorbo, AM. Gomez-Caravaca, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez et G. Lercker. 2007. «Phenolic molecules in virgin olive oil: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade». *Molecules*, vol. 12, no 1679-719.
- Berger, P., et K. Ballmer-Hofer. 2011. «The reception and the party after: how vascular endothelial growth factor receptor 2 explores cytoplasmic space». *Swiss Med Wkly*, vol. 141, p. w13318.
- Bhat, T. A., et R. P. Singh. 2008. «Tumor angiogenesis--a potential target in cancer chemoprevention». *Food Chem Toxicol*, vol. 46, no 4, p. 1334-1345.
- Bikfalvi, A. 2003. «[Tumor angiogenesis]». *Bull Cancer*, vol. 90, no 5, p. 449-458.
- Bouis, D., G. A. Hospers, C. Meijer, G. Molema et N. H. Mulder. 2001. «Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research». *Angiogenesis*, vol. 4, no 2, p. 91-102.
- Braga, C., C. La Vecchia, S. Franceschi, E. Negri, M. Parpinel, A. Decarli, A. Giacosa et D. Trichopoulos. 1998. «Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma». *Cancer*, vol. 82, no 3, p. 448-453.
- Buckland, G., N. Travier, A. Agudo, A. Fonseca-Nunes, C. Navarro, P. Lagiou, C. Demetriou, P. Amiano, M. Dorronsoro, M. D. Chirlaque, J. M. Huerta, E. Molina, M. J. Perez, E. Ardanaz, C. Moreno-Iribas, J. R. Quiros, A. Naska, D. Trichopoulos, M. C. Giurdanella, R. Tumino, C. Agnoli, S. Grioni, S. Panico, A. Mattiello, G. Masala, C. Sacerdote, S. Polidoro, D. Palli, A. Trichopoulou et C. A. Gonzalez. 2012. «Olive oil intake and breast cancer risk in the Mediterranean countries of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study». *Int J Cancer*, vol. 131, no 10, p. 2465-2469.
- Byrne, A. M., D. J. Bouchier-Hayes et J. H. Harmey. 2005. «Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)». *J Cell Mol Med*, vol. 9, no 4, p. 777-794.

- Carmeliet, P., et R. K. Jain. 2011. «Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 10, no 6, p. 417-427.
- Casaburi, I., F. Puoci, A. Chimento, R. Sirianni, C. Ruggiero, P. Avena et V. Pezzi. 2013. «Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies». *Mol Nutr Food Res*, vol. 57, no 1, p. 71-83.
- Charoenprasert, S., et A. Mitchell. 2012. «Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*)». *J Agric Food Chem*, vol. 60, no 29, p. 7081-7095.
- Cicerale, S., L. Lucas et R. Keast. 2010. «Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil». *Int J Mol Sci*, vol. 11, no 2, p. 458-479.
- Cicerale, S., X. A. Conlan, A. J. Sinclair et R. S. Keast. 2009. «Chemistry and health of olive oil phenolics». *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 49, no 3, p. 218-236.
- Cimpean, A. M., D. Ribatti et M. Raica. 2011. «A brief history of angiogenesis assays». *Int J Dev Biol*, vol. 55, no 4-5, p. 377-382.
- Claesson-Welsh, L. 2012. «Blood vessels as targets in tumor therapy». *Ups J Med Sci*, vol. 117, no 2, p. 178-186.
- Comité directeur de la société canadienne du cancer : *Statistiques canadiennes sur le cancer 2012*. Toronto (Ontario) : Société canadienne du cancer, 2012. Mai 2012. ISSN 0835-2976.
- Covas, M. I., K. de la Torre, M. Farre-Albaladejo, J. Kaikkonen, M. Fito, C. Lopez-Sabater, M. A. Pujadas-Bastardes, J. Joglar, T. Weinbrenner, R. M. Lamuela-Raventos et R. de la Torre. 2006. «Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans». *Free Radic Biol Med*, vol. 40, no 4, p. 608-616.
- Cross, M. J., J. Dixelius, T. Matsumoto et L. Claesson-Welsh. 2003. «VEGF-receptor signal transduction». *Trends Biochem Sci*, vol. 28, no 9, p. 488-494.
- Divisi, D., S. Di Tommaso, S. Salvemini, M. Garramone et R. Crisci. 2006. «Diet and cancer». *Acta Biomed*, vol. 77, no 2, p. 118-123.
- Dougher, M., et B. I. Terman. 1999. «Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization». *Oncogene*, vol. 18, no 8, p. 1619-1627.
- Dvorak, H. F. 2005. «Angiogenesis: update 2005». *J Thromb Haemost*, vol. 3, no 8, p. 1835-1842.

- Elamin, M. H., M. H. Daghestani, S. A. Omer, M. A. Elobeid, P. Virk, E. M. Al-Olayan, Z. K. Hassan, O. B. Mohammed et A. Aboussekhra. 2013. «Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells». *Food Chem Toxicol*, vol. 53, p. 310-316.
- Escrich, E., R. Moral, L. Grau, I. Costa et M. Solanas. 2007. «Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer». *Mol Nutr Food Res*, vol. 51, no 10, p. 1279-1292.
- Fabiani, R., A. De Bartolomeo, P. Rosignoli, M. Servili, G. F. Montedoro et G. Morozzi. 2002. «Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis». *Eur J Cancer Prev*, vol. 11, no 4, p. 351-358.
- Ferrara, N. 2009. «VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth». *Eur Cytokine Netw*, vol. 20, no 4, p. 158-163.
- Filik, L., et O. Ozyilkan. 2003. «Olive-oil consumption and cancer risk». *Eur J Clin Nutr*, vol. 57, no 1, p. 191.
- Fistonic, I., M. Situm, V. Bulat, M. Harapin, N. Fistonic et D. Verbanac. 2012. «Olive oil biophenols and women's health». *Med Glas (Zenica)*, vol. 9, no 1, p. 1-9.
- Fito, M., R. de la Torre, M. Farre-Albaladejo, O. Khymenetz, J. Marrugat et M. I. Covas. 2007. «Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review». *Ann Ist Super Sanita*, vol. 43, no 4, p. 375-381.
- Folkman, J. 1971. «Tumor angiogenesis: therapeutic implications». *N Engl J Med*, vol. 285, no 21, p. 1182-1186.
- Folkman, J., D. M. Long, Jr. et F. F. Becker. 1963. «Growth and metastasis of tumor in organ culture». *Cancer*, vol. 16, p. 453-467.
- Folkman, J. 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease». *Nat Med*, vol. 1, no 1, p. 27-31.
- Folkman, J. 2006. «Angiogenesis». *Annu Rev Med*, vol. 57, p. 1-18.
- Folkman, J., et Y. Shing. 1992. «Angiogenesis». *J Biol Chem*, vol. 267, no 16, p. 10931-10934.
- Gingras, D., et R. Béliveau, . 1997. «L'angiogenèse tumorale : une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse». *Médecine/Sciences*, vol. 12, p. 1428-1435.

- Gupta, S. C., J. H. Kim, S. Prasad et B. B. Aggarwal. 2010. «Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 29, no 3, p. 405-434.
- Han, J., T. P. Talorete, P. Yamada et H. Isoda. 2009. «Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells». *Cytotechnology*, vol. 59, no 1, p. 45-53.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*, vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Heydarkhan-Hagvall, S., G. Helenius, B. R. Johansson, J. Y. Li, E. Mattsson et B. Risberg. 2003. «Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors». *J Cell Biochem*, vol. 89, no 6, p. 1250-1259.
- Hoeben, A., B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. Van Oosterom et E. A. De Bruijn. 2004. «Vascular endothelial growth factor and angiogenesis». *Pharmacol Rev*, vol. 56, no 4, p. 549-580.
- Holmes, K., O. L. Roberts, A. M. Thomas et M. J. Cross. 2007. «Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition». *Cell Signal*, vol. 19, no 10, p. 2003-2012.
- Ichihara, E., K. Kiura et M. Tanimoto. 2011. «Targeting angiogenesis in cancer therapy». *Acta Med Okayama*, vol. 65, no 6, p. 353-362.
- Jain, R. K. 2005. «Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy». *Science*, vol. 307, no 5706, p. 58-62.
- Kajdaniuk, D., B. Marek, W. Foltyn et B. Kos-Kudla. 2011. «Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology». *Endokrynol Pol*, vol. 62, no 5, p. 444-455.
- Kamba, T., et D. M. McDonald. 2007. «Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer». *Br J Cancer*, vol. 96, no 12, p. 1788-1795.
- Karamysheva, A. F. 2008. «Mechanisms of angiogenesis». *Biochemistry (Mosc)*, vol. 73, no 7, p. 751-762.
- Katz, M., I. Amit et Y. Yarden. 2007. «Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, no 8, p. 1161-1176.
- Kieran, M. W., R. Kalluri et Y. J. Cho. 2012. «The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward». *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no 12, p. a006593.

- Kendall, R. L., R. Z. Rutledge, X. Mao, A. J. Tebben, R. W. Hungate et K. A. Thomas. 1999. «Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues». *J Biol Chem*, vol. 274, no 10, p. 6453-6460.
- Koch, S., S. Tugues, X. Li, L. Gualandi et L. Claesson-Welsh. 2011. «Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors». *Biochem J*, vol. 437, no 2, p. 169-183.
- Kontou, N., T. Psaltopoulou, D. Panagiotakos, M. A. Dimopoulos et A. Linos. 2011. «The mediterranean diet in cancer prevention: a review». *J Med Food*, vol. 14, no 10, p. 1065-1078.
- Lamallice, L., F. Houle et J. Huot. 2006. «Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF». *J Biol Chem*, vol. 281, no 45, p. 34009-34020.
- Lamy, S., E. Beaulieu, D. Labbe, V. Bedard, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling». *Carcinogenesis*, vol. 29, no 5, p. 1033-1041.
- Lamy, S., V. Bedard, D. Labbe, H. Sartelet, C. Barthomeuf, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «The dietary flavones apigenin and luteolin impair smooth muscle cell migration and VEGF expression through inhibition of PDGFR-beta phosphorylation». *Cancer Prev Res (Phila)*, vol. 1, no 6, p. 452-459.
- Lamy, S., D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation». *Cancer Res*, vol. 62, no 2, p. 381-385.
- Lee, S. B., K. H. Cha, D. Selenge, A. Solongo et C. W. Nho. 2007. «The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation». *Biol Pharm Bull*, vol. 30, no 6, p. 1074-1079.
- Li, W. W., V. W. Li, M. Hutnik et A. S. Chiou. 2012. «Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention». *J Oncol*, vol. 2012, p. 879623.
- Liekens, S., E. De Clercq et J. Neyts. 2001. «Angiogenesis: regulators and clinical applications». *Biochem Pharmacol*, vol. 61, no 3, p. 253-270.
- Matsumoto, T., S. Bohman, J. Dixelius, T. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J. H. Qi, C. Wernstedt, J. Wu, S. Bruheim, H. Mugishima, D. Mukhopadhyay, A. Spurkland et L. Claesson-Welsh. 2005. «VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis». *EMBO J*, vol. 24, no 13, p. 2342-2353.

- Misirli, G., V. Benetou, P. Lagiou, C. Bamia, D. Trichopoulos et A. Trichopoulou. 2012. «Relation of the traditional Mediterranean diet to cerebrovascular disease in a Mediterranean population». *Am J Epidemiol*, vol. 176, no 12, p. 1185-1192.
- Munoz-Chapuli, R. 2011. «Evolution of angiogenesis». *Int J Dev Biol*, vol. 55, no 4-5, p. 345-351.
- Niu, G., et X. Chen. 2010. «Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy». *Curr Drug Targets*, vol. 11, no 8, p. 1000-1017.
- Omar, S. H. 2010. «Oleuropein in olive and its pharmacological effects». *Sci Pharm*, vol. 78, no 2, p. 133-154.
- Owen, R. W., A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder et H. Bartsch. 2000a. «The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil». *Eur J Cancer*, vol. 36, no 10, p. 1235-1247.
- Owen, R. W., A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, G. Wurtele, B. Spiegelhalder et H. Bartsch. 2000. «Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants». *Lancet Oncol*, vol. 1, p. 107-112.
- Park, H. J., Y. Zhang, S. P. Georgescu, K. L. Johnson, D. Kong et J. B. Galper. 2006. «Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis». *Stem Cell Rev*, vol. 2, no 2, p. 93-102.
- Park, S. Y., C. W. Nho, D. Y. Kwon, Y. H. Kang, K. W. Lee et J. H. Park. 2013. «Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: possible mediation via hypoxia-inducible factor-1alpha signalling». *Br J Nutr*, vol. 109, no 2, p. 210-222.
- Pauwels, EK. 2011. «The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk». *Med Princ Pract*, vol. 20, p. 103-111.
- Pelucchi, C., C. Bosetti, E. Negri, L. Lipworth et C. La Vecchia. 2011. «Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010». *Curr Pharm Des*, vol. 17, no 8, p. 805-812.
- Psaltopoulou, T., R. I. Kostis, D. Haidopoulos, M. Dimopoulos et D. B. Panagiotakos. 2011. «Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies». *Lipids Health Dis*, vol. 10, p. 127.

- Rafehi, H., A. J. Smith, A. Balcerczyk, M. Ziemann, J. Ooi, S. J. Loveridge, E. K. Baker, A. El-Osta et T. C. Karagiannis. 2012. «Investigation into the biological properties of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis». *Genes Nutr*, vol. 7, no 2, p. 343-355.
- Rafehi, H., K. Ververis et T. C. Karagiannis. 2012. «Mechanisms of action of phenolic compounds in olive». *J Diet Suppl*, vol. 9, no 2, p. 96-109.
- Ribatti, D., et E. Crivellato. 2012. «"Sprouting angiogenesis", a reappraisal». *Dev Biol*, vol. 372, no 2, p. 157-165.
- Scoditti, E., N. Calabriso, M. Massaro, M. Pellegrino, C. Storelli, G. Martines, R. De Caterina et M. A. Carluccio. 2012. «Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer». *Arch Biochem Biophys*, vol. 527, no 2, p. 81-89.
- Senger, D. R., D. T. Connolly, L. Van de Water, J. Feder et H. F. Dvorak. 1990. «Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor». *Cancer Res*, vol. 50, no 6, p. 1774-1778.
- Serra, A., L. Rubio, X. Borrás, A. Macia, M. P. Romero et M. J. Motilva. 2012. «Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake». *Mol Nutr Food Res*, vol. 56, no 3, p. 486-496.
- Shen, K., L. Ji, B. Lu et Z. Wang. 2012. «c-Jun N-terminal kinase mediated VEGFR2 sustained phosphorylation is critical for VEGFA-induced angiogenesis in vitro and in vivo». *Cell Biochem Biophys*, vol. 64, no 1, p. 17-27.
- Shibuya, M. 2011. «Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies». *Genes Cancer*, vol. 2, no 12, p. 1097-1105.
- Sofi, F., R. Abbate, G. F. Gensini et A. Casini. 2010. «Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis». *Am J Clin Nutr*, vol. 92, no 5, p. 1189-1196.
- Suarez, M., M. P. Romero, A. Macia, R. M. Valls, S. Fernandez, R. Sola et M. J. Motilva. 2009. «Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry». *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 877, no 32, p. 4097-4106.

- Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida et M. Shibuya. 2001. «A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells». *EMBO J*, vol. 20, no 11, p. 2768-2778.
- Terzuoli, E., S. Donnini, A. Giachetti, M. A. Iniguez, M. Fresno, G. Melillo et M. Ziche. 2010. «Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis». *Clin Cancer Res*, vol. 16, no 16, p. 4207-4216.
- Trichopoulou, A., et V. Dilis. 2007. «Olive oil and longevity». *Mol Nutr Food Res*, vol. 51, no 10, p. 1275-1278.
- Trichopoulou, A., et P. Lagiou. 1997. «Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle». *Nutr Rev*, vol. 55, no 11 Pt 1, p. 383-389.
- Trichopoulou, A., P. Lagiou, H. Kuper et D. Trichopoulos. 2000. «Cancer and Mediterranean dietary traditions». *CANCER EPIDEM BIOMAR*, vol. 9, p. 869-873.
- Uchida, C., E. Gee, E. Ispanovic et T. L. Haas. 2008. «JNK as a positive regulator of angiogenic potential in endothelial cells». *Cell Biol Int*, vol. 32, no 7, p. 769-776.
- Underiner, T. L., B. Ruggeri et D. E. Gingrich. 2004. «Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy». *Curr Med Chem*, vol. 11, no 6, p. 731-745.
- Verberne, L., A. Bach-Faig, G. Buckland et L. Serra-Majem. 2010. «Association between the Mediterranean diet and cancer risk: a review of observational studies». *Nutr Cancer*, vol. 62, no 7, p. 860-870.
- Visioli, F., C. Galli, F. Bornet, A. Mattei, R. Patelli, G. Galli et D. Caruso. 2000. «Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans». *FEBS Lett*, vol. 468, no 2-3, p. 159-160.
- Visioli, F., A. Poli et C. Gall. 2002. «Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil». *Med Res Rev*, vol. 22, no 1, p. 65-75.
- Vissers, M. N., P. L. Zock et M. B. Katan. 2004. «Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review». *Eur J Clin Nutr*, vol. 58, no 6, p. 955-965.
- Vissers, M. N., P. L. Zock, A. J. Roodenburg, R. Leenen et M. B. Katan. 2002. «Olive oil phenols are absorbed in humans». *J Nutr*, vol. 132, no 3, p. 409-417.
- Warleta, F., C. S. Quesada, M. Campos, Y. Allouche, G. Beltran et J. J. Gaforio. 2011. «Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells». *Nutrients*, vol. 3, no 10, p. 839-857.

- Waterman, E., et B. Lockwood. 2007. «Active components and clinical applications of olive oil». *Altern Med Rev*, vol. 12, no 4, p. 331-342.
- Wiseman, M. 2008. «The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective». *Proc Nutr Soc*, vol. 67, no 3, p. 253-256.
- Wong, A. H., Gottesman, II et A. Petronis. 2005. «Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective». *Hum Mol Genet*, vol. 14 Spec No 1, p. R11-18.
- Young, R. J., et M. W. Reed. 2012. «Anti-angiogenic therapy: concept to clinic». *Microcirculation*, vol. 19, no 2, p. 115-125.
- Yuan, L., I. S. Ahn et P. F. Davis. 2007. «Inhibition of tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptors in human umbilical vein endothelial cells: a potent anti-angiogenic lipid-rich extract from shark». *J Med Food*, vol. 10, no 4, p. 657-661.
- Yuan, L., M. Yoshida et P. F. Davis. 2006. «Inhibition of pro-angiogenic factors by a lipid-rich shark extract». *J Med Food*, vol. 9, no 3, p. 300-306.
- Zeng, H., S. Sanyal et D. Mukhopadhyay. 2001. «Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively». *J Biol Chem*, vol. 276, no 35, p. 32714-32719.
- Zrelli, H., M. Matsuka, M. Araki, M. Zarrouk et H. Miyazaki. 2011. «Hydroxytyrosol induces vascular smooth muscle cells apoptosis through NO production and PP2A activation with subsequent inactivation of Akt». *Planta Med*, vol. 77, no 15, p. 1680-1686.